

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie

**Klassisch konditionierte Effekte auf die Lymphozytenzirkulation und
Zytokinsynthese beim Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Almuth Elisabeth Trebst
aus Bochum
2003

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. biol. hum. Dipl.-Psych. M. Schedlowski
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. E. Kreuzfelder

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 2004

Publikationen

Artikel

Goebel MU, Trebst AE, Steiner JF, Xie YF, Exton MS, Frede S, Michel MC, Heemann U, Schedlowski M. (2002): Behavioral conditioning is possible in man FASEB J. 16, 1869-1873.

Publizierte Abstracts

Goebel MU, Xie YF, Trebst AE, Steiner JF, Exton MS, Frede S, Michel MC, Heemann U, Schedlowski M. (2001): Behavioral conditioning: animal foundations and human investigations. Immunobiology 204, 373-374.

Goebel MU, Trebst AE, Steiner J, Xie XF, Exton MS, Frede S, Canbay A, Michel MC, Heemann U, Schedlowski M (2001): Behaviorally conditioned immunosuppression: animal foundations and human investigation. Brain Behav Immun 15,131.

Goebel MU, Trebst AE, Steiner J, Xie XF, Exton MS, Frede S, Canbay A, Michel MC, Heemann U, Schedlowski M (2001): Konditionierte Immunsuppression: tier- und humanexperimentelle Befunde. Zeitschrift für Medizinische Psychologie 10, 85.

Goebel MU, Xie XF, Trebst AE, Steiner J, Exton MS, Frede S, Canbay A, Michel MC, Heemann U, Schedlowski M (2002): Immunosuppression in humans is inducible via behavioral conditioning. Psychosom Med 64, 149.

Goebel MU, Xie YF, Trebst AE, Steiner JF, Exton MS, Frede S, Michel MC, Heemann U, Schedlowski M. (2002): Behavioral conditioning induces immunosuppression in man. J Behav Med 9, 96.

Posterpräsentation

Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Gesamthochschule Essen, 13.06.2002

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Klassische Konditionierung	8
1.2 Konditionierung immunologischer Funktionen.....	9
1.2.1 Historischer Rückblick	9
1.2.2 Klassisch konditionierte Immunreaktionen.....	11
1.2.2.1 <i>Humorale Immunität</i>	11
1.2.2.2 <i>Zelluläre Immunität</i>	11
1.2.2.3 <i>Leukozytensubpopulationen</i>	12
1.3 Mechanismen der Konditionierung	12
1.3.1 Stresshypothese und HPA-Achse.....	13
1.3.2 Hormonrezeptoren als zentrale und periphere Vermittlungsträger	14
1.3.3 Neuroanatomische Korrelate	15
1.4 Konditionierung beim Menschen.....	16
1.4.1 Klinische Onkologie und immunsuppressive Konditionierung.....	16
1.4.2 Allergische Reaktionen und Autoimmunerkrankungen	16
1.5 Biologische Relevanz der konditionierten Effekte auf das Immunsystem	18
1.5.1 Transplantationsmedizin.....	18
1.5.2 Autoimmunerkrankungen.....	19
1.5.3 Konditionierung vor dem Hintergrund klinischer Situationen	19
1.6 Fragestellung.....	20
2 Studienprotokoll und Methode.....	21
2.1 Probanden	21
2.2 Versuchsgruppe	21
2.3 Der konditionierte Stimulus	22
2.4 Cyclosporin A als unkonditionierter Stimulus.....	23
2.4.1 Hintergrund und Wirkungsweise	23
2.4.2 Applikation	24
2.5 Studienablauf.....	24
2.6 Immunologische Parameter	27

2.6.1	Differentialblutbilder	27
2.6.2	Isolation peripherer Blutlymphozyten	27
2.6.3	Durchflusszytometrische Analysen	27
2.6.3.1	<i>Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen</i>	28
2.6.3.2	<i>Bestimmung der intrazellulären Zytokinsynthese von T-Lymphozyten in vitro</i>	29
2.6.4	Bestimmung der Zytokinsekretion stimulierter Lymphozyten <i>in vitro</i>	30
2.7	Endokrinologische Parameter	31
2.8	Messung des Cyclosporin A-Spiegels im Blut	31
2.9	Analyse der Daten und Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Anamnestiche Daten.....	33
3.2	Subjektive Beurteilung des konditionierten Stimulus	33
3.3	CsA-Spiegel	35
3.4	Kardiovaskuläre Parameter	36
3.5	Immunologische Parameter	37
3.5.1	Differentialblutbilder	37
3.5.2	Lymphozytensubpopulationen	38
3.5.3	Intrazelluläre Zytokinsynthese von T-Lymphozyten <i>in vitro</i>	42
3.5.4	Zytokinsekretion stimulierter Lymphozyten <i>in vitro</i>	48
3.6	Endokrinologische Parameter.....	49
4	Diskussion	51
4.1	Geschmacksaversion	52
4.2	Kardiovaskuläre Parameter.....	53
4.3	Zirkulation und Distribution der Leukozyten	53
4.4	Zytokinsynthese der T-Lymphozyten	54
4.5	Cortisol.....	57
4.6	Fazit und Ausblick.....	58
	Zusammenfassung	60
	Literaturverzeichnis	61
	Lebenslauf	67

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocortikotrope Hormon
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	Gruppenbezeichnung für humane Leukozytenantigene (cluster of differentiation)
CO ₂	Kohlendioxid
CR	Konditionierte Reaktion (conditioned response)
CRH	Corticotrope Releasing Hormone
CS	konditionierter Stimulus (conditioned stimulus)
CsA	Cyclosporin A
CTA	Geschmacksaversionsparadigma (conditioned taste aversion)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (fluorescence activated cell sorter)
F-Rezeptor	Fc-Fragment (fragment crystallizable)
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward light scatter)
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Regelkreis (hypothalamus-pituitary-adrenal-axis)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
mRNA	messenger ribonucleotidacid
NCAM	CD56-Antigen (neural cell adhesion molecule)
NF-AT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
OVA	Ovalbumin

PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphat buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
Poly I:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
rpm	Umdrehungen (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter)
STKS	Beckmann Coulter Counter Electronics
UCS	unkonditionierter Stimulus (unconditioned stimulus)
UCR	unkonditionierte Reaktion (unconditioned reaction)

1 Einleitung

1.1 Klassische Konditionierung

Den Begriff der Klassischen Konditionierung begründete der spätere Nobelpreisträger Ivan Petrowitsch Pawlow. Das Prinzip der Klassischen Konditionierung besteht im wesentlichen in der Darbietung von zwei Stimuli in enger zeitlicher Abfolge. Grundlage ist stets eine spezifische physiologische Reaktion, die unkonditionierte Reaktion (UCR), die durch einen bestimmten Reiz wiederholt und verbindlich hervorgerufen werden kann. Dieser Reiz wird unkonditionierter Stimulus (UCS) genannt. Ziel ist es, diese physiologische Reaktion durch einen anderen, bisher bedeutungslosen Stimulus auszulösen. Dieser konditionierte Stimulus (CS) ist meist ein neutraler sensorischer Reiz, der einen oder mehrere der 5 Sinne wahrnehmbar anspricht. In kurzer zeitlicher Abfolge wird zunächst der konditionierte und anschließend der unkonditionierte Stimulus dargeboten. Nach mehrmaliger CS-UCS Paarung ist der konditionierte Reiz in der Lage, die gleiche Reaktion auszulösen, die dann konditionierte Reaktion (CR) genannt wird. Erfolgreich ist die Konditionierung, wenn die konditionierte Reaktion durch alleinige Gabe des vorher neutralen Stimulus ausgelöst werden kann.

Pawlow entdeckte diesen Lernvorgang in seinen Experimenten zum physiologischen Speichelfluss bei Hunden (Abbildung 1.1).

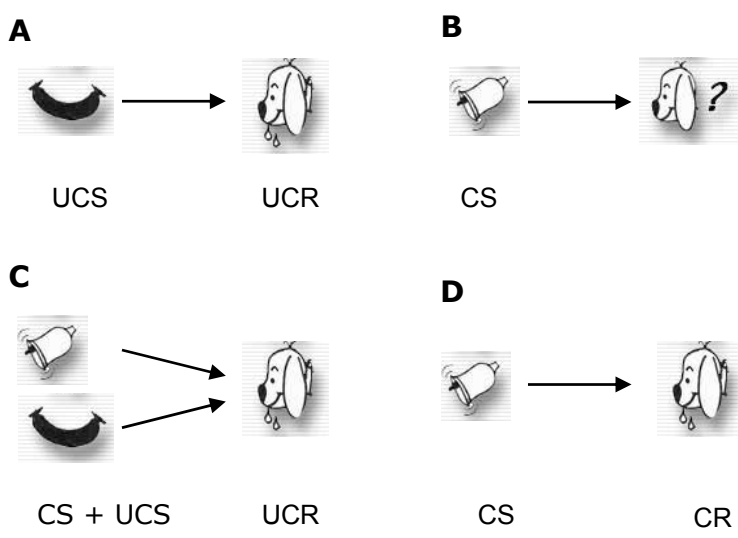


Abbildung 1.1: Darstellung der Klassischen Konditionierung im Pawlow'schen Hundeversuch (A-D)

Dem Hund wurde ein unbedingter Reiz (UCS: Futter) präsentiert, woraufhin er den angeborenen Reflex (UCR: Speichelfluss) zeigte (Abbildung 1.1 A). Auf das Läuten

einer Glocke (CS) zeigte der Hund keinerlei Reaktion, außer einer gewissen Neugier (Abbildung 1.1 **B**). Wurden beide Reize gleichzeitig dargeboten (UCS und CS), reagierte der Hund immer noch mit Speichelfluss (UCR) (Abbildung 1.1 **C**). Wurde nach mehrmaligem Wiederholen dieser kontingenten oder gleichzeitigen Reizpräsentationen der UCS weggelassen und das Glockenläuten dargeboten, reagierte der Hund mit Speichelfluss (Abbildung 1.1 **D**). Diese Reaktion wurde konditionierte Reaktion genannt (CR).

1.2 Konditionierung immunologischer Funktionen

1.2.1 Historischer Rückblick

Die ersten Konditionierungsarbeiten zu immunologischen Funktionen lassen sich auf Metal'nikov und Chorine in den 1920ern zurückführen (Metal'nikov & Chorine 1926). Als Mitarbeiter Pawlows untersuchten sie die Klassische Konditionierung und versuchten, bei Meerschweinchen Reaktionen des Immunsystems zu konditionieren. Dabei paarten sie die intraperitoneale Injektion des Pflanzenextraktes Tapioka (UCS), welches ein Anstieg der Leukozytenzahlen in der Peritonealflüssigkeit hervorruft (UCR), mit dem Erhitzen oder Ankratzen der Haut als konditioniertem Stimulus (CS). Nach mehrmaligen CS-UCS Paarungen erhöhte sich die Leukozytenzahl auch bei alleinigem Erhitzen oder Ankratzen der Haut (CR).

In Folgeversuchen konnten sie eine schützende Immunstimulation gegen Milzbrand- und Choleraerreger konditionieren. In der Gruppe der konditionierten Ratten gegenüber der unkonditionierten Kontrollgruppe war eine geringere Mortalität zu verzeichnen. Als konditionierter Stimulus diente wiederum das Erhitzen oder Ankratzen der Haut (Metal'nikov & Chorine 1926).

Diese ersten Versuche zur Immunmodulation zeigten somit eine Immunaktivierung durch einen Reiz, der ursprünglich neutral war und keine immunmodulatorischen Wirkungen hatte. Trotz der durch die Autoren hervorgehobenen Bedeutsamkeit der Versuche, fanden in den nächsten Jahren kaum Studien in diesem Bereich statt.

Erst in den siebziger Jahren geriet die Erforschung der Konditionierung immunologischer Funktionen wieder in den Vordergrund. Anstoß war die Entdeckung von Robert Ader, einem amerikanischen Psychiater, dass sich immunsuppressive Effekte konditionieren lassen.

Durch Zufall erkannte er dies, als er in Tierversuchen das von John Garcia erstmals verwendete und benannte Geschmacksaversionsparadigma (CTA = conditioned taste aversion) nachahmte (Garcia et al. 1955).

Charakteristisch für die CTA ist das Meiden von zuvor bedeutungslosen gustatorischen und olfaktorischen Stimuli, wenn sie mit einer Substanz (Pharmakon oder Nahrungsmittel) assoziiert wurden, die gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit oder Erbrechen hervorruft. Im Anschluss kann allein der Geschmacks- oder Geruchsreiz Übelkeit hervorrufen (CTA). Von großer Bedeutung ist auch, dass bei der CTA in der Regel eine einmalige Paarung ausreicht, um eine Aversion und somit verminderte Aufnahme des Stoffes zu bewirken. Das Tier lernt, diesen vorher neutralen und bedeutungslosen Geschmack oder Geruch mit der krankmachenden Wirkung des UCS zu assoziieren. In Tierversuchen wird häufig eine Saccharin-Lösung als konditionierter Stimulus eingesetzt. Auch Ader bediente sich dieser in den hier angesprochenen Versuchen (Ader & Cohen 1975). Nach gleichzeitiger Präsentation der Saccharin-Lösung als konditioniertem Stimulus mit der Gabe von Cyclophosphamid, das für seine gastrointestinalen Nebenwirkungen bekannt ist, zeigten die Versuchstiere bei späterer alleiniger Präsentation eine konditionierte Geschmacksaversion gegen die Saccharin-Lösung. Diese Aversion begründete sich auf einer Assoziation des Saccharins mit der durch Cyclophosphamid hervorgerufenen Übelkeit.

Zusätzlich zu dieser Verhaltensänderung im Sinne der CTA fiel auf, dass die Mortalität unter den konditionierten Tieren erhöht war. Da Ader und Cohen Cyclophosphamid als UCS gewählt hatten, hatten sie nicht nur ein Medikament gewählt, das gastrointestinale Beschwerden hervorruft, sondern auch ein potentes Immunsuppressivum in der Klinik eingesetzt wird. Als der Parameter für die Immunsuppression galt das Ausmaß der Antikörperproduktion auf ein injiziertes Schaferythrozytenantigen.

Somit konnte seine Arbeitsgruppe nachweisen, dass die immunsuppressiven Wirkungen von Cyclophosphamid durch Paarung mit der Saccharinlösung anschließend auch von Saccharin alleine ausgelöst werden konnten.

Diese Versuche von Ader und Cohen waren die Grundlage für den Aufbau eines neuen Forschungsbereiches mit dem Namen Psychoneuroimmunologie. Dieser verfolgt den Gedanken, dass Zusammenspiel zwischen dem Immun-, Hormon- und Nervensystem zu ergründen. Ein wesentlicher Bereich widmete sich dabei weiterhin

der Erforschung der Klassischen Konditionierung immunologischer Funktionen (Ader & Cohen 2001a).

1.2.2 Klassisch konditionierte Immunreaktionen

1.2.2.1 Humorale Immunität

Seit den angesprochenen Experimenten von Ader und Cohen wiederholten einige Arbeitsgruppen erfolgreich diese ersten Versuche der Konditionierung der humoralen, d.h. antikörpervermittelten Immunität (Rogers et al. 1976).

Weitere Versuche beschäftigten sich mit Erwerb und/oder Löschung der konditionierten Immunsuppression der Antikörperproduktion (Ader et al. 1982; Bovbjerg et al. 1987). Nur wenige Studien beschäftigten sich mit der Konditionierung von Immunstimulation, gemessen z.B. wiederum an der humoralen Antikörperproduktion. Husband et al. veröffentlichte 1993 eine Studie zu diesem Thema. Seiner Arbeitsgruppe war es gelungen, Saccharinlösung (CS) mit einem Proteinantigen, Ovalbumin (OVA), so zu paaren, dass auch die Reexposition der Lösung allein zu einem deutlich gesteigerten Anti-OVA Antikörpertiter gegenüber der Kontrollgruppe führte (Husband et al. 1993b).

1.2.2.2 Zelluläre Immunität

Ein entscheidender weiterer Schritt bestand im Versuch, die konditionierte Immunmodulation auch auf die zelluläre Immunität auszuweiten. Zunächst wird dies hier anhand einiger Beispiele der immunstimulatorischen Konditionierung aufgezeigt. Die Aktivität natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) lässt sich mit einer Injektion der Substanz Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) über den Botenstoff Interferon stimulieren. Die Gruppe um Hiramoto und Ghanta nutzte dies in zahlreichen Konditionierungsstudien mit Kampfergeruch als konditioniertem Stimulus. In der Reexposition zeigte sich, dass auch die alleinige Präsentation des Geruchs im Stande ist, eine Stimulation der NK-Zellaktivität hervorzurufen (Ghanta et al. 1985). Aber nicht nur die NK-Zellen, sondern auch die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen ließ sich in einem anderen Studienprotokoll, dass als unkonditionierten Stimulus ein Antigen, ein Alloantigen gegen transplantierte Haut, benutzte, konditionieren (Gorczynski et al. 1982).

Als Beispiele für konditionierte Immunsuppression lassen sich die Arbeiten von Exton et al. anführen. In diesen Arbeiten nach dem Geschmacksaversionsparadigma führte

die Paarung einer Saccharin-Lösung als CS mit einer i.p. Injektion von Cyclosporin A (CsA) zu einer ausgeprägten CTA gegen die Lösung. Weiterhin zeigte sich insbesondere eine Verringerung von Thymus- und Milzgewicht (Exton et al. 1998c), signifikant erniedrigte Zytokinspiegel des Interleukin-2 (Exton et al. 1998b; von Horsten et al. 1998) und eine signifikante Verminderung der *in vitro* Proliferationsrate von Lymphozyten der Milz (Exton et al. 1998b; Exton et al. 1998c). Wichtig ist, dass die genannten Veränderungen funktioneller Art waren und auf einer konstanten Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen und deren absoluten Zahlen basierte.

1.2.2.3 Leukozytensubpopulationen

Ein Bereich der Konditionierungsarbeiten beschäftigte sich mit der Frage, ob die Konditionierungseffekte von einzelnen Subpopulationen entscheidend beeinflusst und ausgeführt werden. Zunächst wurde angenommen, dass die T-Zellen und auch das Verhältnis der T-Zellsubpopulationen zueinander entscheidend in dem Prozess involviert sind. Diese Hypothese basierte auf der Erkenntnis, dass die Suppression der Lymphozytenproliferation als Antwort auf T-Zell-Mitogene, aber nicht oder nicht hinreichend auf B-Zell-Mitogene konditioniert werden kann (Kusnecov et al. 1988). Einige wenige Experimente versuchten, eine Konditionierung mit T-Zell unabhängigen Antigen durchzuführen. Zu diesem Zweck bekamen Mäuse LPS, ein bakterielles Antigen, das murine B-Zellen ohne Beeinflussung der Makrophagen oder T-Zellen stimuliert (Morato et al. 1997). Die Erfolge dieser Studie deuten an, dass auch B-Zellen und nicht nur T-Zellen in den Ablauf der Konditionierung involviert sein können (Ader & Cohen 2001). Die besprochenen Versuche konzentrierten sich auf die Zellzahlen und -funktionen in den Immunorganen, speziell der Milz. Andere Studien beweisen, dass aber auch in der Peripherie eine Konditionierung der Gesamtleukozyten (Klosterhalfen & Klosterhalfen 1987) und der Zirkulation spezifischer Lymphozytensubpopulationen (Husband et al. 1987) möglich ist.

1.3 Mechanismen der Konditionierung

Nachdem sich die Methode der Konditionierung von Immunfunktionen in vielerlei Bereichen repliziert und etabliert hatte, weitete sich das Interesse in die Richtung des anatomisch-physiologischen Korrelates, des Mechanismus der Konditionierung aus.

1.3.1 Stresshypothese und HPA-Achse

Die ersten Versuche zur Klassischen Konditionierung von Immunfunktionen warfen schnell die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus auf. Lange stand die Frage im Raum, ob die Erfolge wirklich durch Konditionierung und nicht durch Stresseffekte zu erklären seien. Speziell das Paradigma der Geschmacksaversion mit der Abneigung gegen die Saccharinlösung und die gastrointestinalen Beschwerden stelle einen ausreichend starken Stressor dar, durch den sich die gefundenen Immunmodulationen erklären ließen (Meier et al. 2002).

Der Stresshypothese lag der Gedanke zugrunde, dass die CTA eine vermehrte Ausschüttung des „Stresshormon“ Cortisol durch eine Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Regelkreises (HPA-Achse) bewirke. Die ersten Arbeiten von Kelly bestätigten die Hypothese. Sie zeigten, dass Lithiumchlorid, eine Substanz mit ausgeprägter gastrointestinaler, aber hingegen keiner immunmodulatorischen Wirkung, gepaart mit Saccharin nach dem CTA-Paradigma immunsuppressive Effekte hervorrief (Kelly et al. 1985).

In den fortführenden Arbeiten konnte die Kausalität dieser Stresstheorie jedoch widerrufen werden. Zum einen konnte Immunsuppression auch ohne Geschmacksaversion (Ader et al. 1987; Kelly et al. 1985) und gastrointestinale Beschwerden (Kusnecov et al. 1983) konditioniert werden, und zum anderen unterlag das Hormon Cortisol in vielerlei Studien, in denen erfolgreich Immunmodulation konditioniert wurde, keinen Veränderungen im peripheren Blut und den peripheren Organen (Exton et al. 1999; Klosterhalfen & Klosterhalfen 1990).

Interessanterweise fand man hingegen eine Beteiligung des Hormons ACTH, dem hypophysären Hormon der HPA-Achse bei der Vermittlung der konditionierten NK-Zellaktivität. Dieses Hormon lag nach der Konditionierung mit Kampfergeruch und Poly I:C im peripheren Blut in erhöhter Konzentration vor (Hsueh et al. 1994). Diese Erhöhung ließ sich durch Dexamethason, ein synthetisches Glukokortikoid, das durch ein negatives Feedback die ACTH-Ausschüttung hemmt, blockieren. Die Blockade des ACTH verhinderte in diesem Versuch die Konditionierung der NK-Zellaktivität und somit kann ACTH eine Rolle als efferenter Mediator in der Vermittlung der Konditionierung der NK-Zellaktivität zugesprochen werden (Hsueh et al. 1994).

1.3.2 Hormonrezeptoren als zentrale und periphere Vermittlungsträger

Adrenerge Rezeptoren

Ein alternativer Gedanke zur HPA-Achse ist die Kommunikation des ZNS als Ort der Verschaltung von CS und UCS und der ausführenden Organe des Immunsystems über neurale Innervation. Die Gruppe um Exton untersuchte die Möglichkeit, ob die Konditionierung von immunsuppressiven Effekten von CsA gemessen an der Lymphozytenproliferation und der Zytokinproduktion der Milz durch den Milznerven gesteuert wird. Denervation dieses peripheren Nerven, dessen Transmitter Noradrenalin ist, blockierte die konditionierten Effekte (Exton et al. 1998b). Weiterführende Versuche der Arbeitsgruppe beschäftigten sich zum einen mit der Frage, ob die periphere Applikation von β -Rezeptor-Blockern des adrenergen Systems in der Lage ist, ebenso wie die Denervation des Milznerven, den konditionierten Effekt zu verhindern. Und auf der anderen Seite war es von Interesse, ob β -Rezeptor-Agonisten die konditionierten Effekte hervorrufen können. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Klassisches Konditionieren von Milzfunktionen über das sympathische Nervensystem reguliert wird und β -Rezeptoren maßgeblich daran beteiligt sind. Allerdings scheinen noch andere Mechanismen beteiligt zu sein, da sich die konditionierte Reaktion nicht vollständig blockieren ließ (Exton et al. 2002).

Zu dieser Annahme war auch schon früher die amerikanische Gruppe um Lysle gekommen. In einer Reihe von Studien konnte sie den Einfluß der β -Rezeptoren in der Vermittlung der konditionierten immunsuppressiven Effekte mit Morphin als UCS belegen (Lysle et al. 1991). Mit Gabe von peripheren β -Blockern vor der Reexposition konnte die Abnahme der Proliferationsfähigkeit der Milzlymphozyten blockiert werden, hingegen ließ sich die NK-Zellaktivität nicht beeinflussen. Die Studie von Hsueh et al. (1999) beschäftigte sich näher mit dem Mechanismus der NK-Zellkonditionierung, und sie konnten zentrale adrenerge Rezeptoren als Vermittler des efferenten Signals identifizieren (Hsueh et al. 1999).

Opioide Rezeptoren

Auch bei den endogenen Opioiden geht man davon aus, dass sie eine zentrale Rolle nicht nur für die Vermittlung der Informationen zwischen Nervensystem und Immunsystem, sondern auch an der zentralen Verschaltung des CS mit dem UCS haben.

Diese Vermutung basiert auf Versuchen mit zentral und peripher wirksamen Opioidantagonisten. Zentrale Antagonisten, die im Gegensatz zu den peripheren Antagonisten die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, waren in der Lage, die konditionierte NK-Zell-Erhöhung zu blockieren. Periphere Antagonisten vermochten dies nicht (Hiramoto et al. 1993; Solvason et al. 1992). Opioide können an mehreren Rezeptoren wirksam werden, für die Vermittlung der Konditionierung vermutet man den μ -Rezeptor als Angriffspunkt (Hsueh et al. 1996; Coussons-Read et al. 1994; Perez & Lysle D. T. 1997).

1.3.3 Neuroanatomische Korrelate

Die zuvor beschriebenen Mechanismen zeigen Ansätze auf, die den efferenten Weg der Konditionierung, also vom Zentralnervensystem zum Immunsystem, erklären können. Dies wirft die Frage auf, wo genau im zentralen Nervensystem die Konditionierung, also das Verknüpfen von CS und UCS, abläuft. Erste Hinweise ergaben Läsionsstudien. Die bilaterale Läsionen des Inselkortex und der basolateralen Kerngebiete der Amygdala verhinderten die Konditionierung von Antikörperproduktion und zwar sowohl bei immunstimulierenden als auch immunsuppressiven Effekten (Ramírez-Amaya & Bermúdez-Rattoni F. 1999). Den Einfluß des Inselkortex hatte 1985 schon Garcia, der Begründer des Geschmacksaversionsparadigma, als wichtigen Faktor für den Erwerb und Abruf der CTA festgestellt (Garcia et al. 1985). In weiteren Studien erforschte man den zeitlichen Zusammenhang der Läsionen zum einen im Inselkortex und zum anderen in Kernen der Amygdala mit dem Ablauf des Konditionierungsprotokolls. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass der Inselkortex sowohl für die Assoziation des CS mit dem UCS als auch für den Abruf der konditionierten Immunmodulation zuständig ist, während die Amygdala ausschließlich die Assoziation nicht aber den Abruf verhindert (Ramírez-Amaya et al. 1998).

Neuere Studien beschäftigen sich mit der Frage nach der afferenten Verbindung in der Kommunikation zwischen Immun- und Zentralnervensystem. 2002 gelang es, einige Hirnareale im Hirnstamm und Vorderhirn für die afferente Verschaltung der immunmodulatorischen Wirkung des Proteinantigen KLH (keyhole limpet hemocyanin) zu identifizieren. Die Expression des c-Fos in diesen Arealen korrelierte dabei mit der Antigenität und dem Ausmaß der Immunantwort (Pacheco-Lopez et al. 2002).

1.4 Konditionierung beim Menschen

1.4.1 Klinische Onkologie und immunsuppressive Konditionierung

Im Bereich der Humankonditionierung gibt es nicht sehr viele experimentelle Studien, die eine erfolgreiche klassische Konditionierung aufweisen können. Im klinischen Alltag der Onkologie hingegen trifft man häufig auf Zeichen einer stattgefundenen Konditionierung. Bei Patienten, die in chemotherapeutischer Behandlung stehen, ist auffällig, dass sie die häufigen gastrointestinalen Nebenwirkungen der Chemotherapeutika mit Stimuli aus der Krankenhausumgebung assoziieren. So kann zum Beispiel schon der Anblick oder Geruch des Krankenhauses Übelkeit und Erbrechen bei den Patienten hervorrufen (Bovbjerg et al. 1992).

Eine experimentelle Studie von Stockhorst et al. (2000) konnte zeigen, dass pädiatrische Krebspatienten nicht nur eine antizipatorische Übelkeit und Erbrechen gegenüber der zeitlich kontingenten Stimuli mit der Chemotherapie entwickelten, sondern auch im Sinne der immunsuppressiven Wirkung der Chemotherapeutika eine signifikante Reduktion immunologischer Parameter wie der NK-Zell-Aktivität und Interferon- γ Konzentrationen (Stockhorst et al. 2000b).

Eine andere Studie zur klassischen Konditionierung von immunsuppressiven Effekten am Menschen benutzte Interferon- γ als unkonditionierten Stimulus gepaart mit einem neuartig schmeckenden Getränk. Die Erfolge der Studie suggerieren die Möglichkeit der klassischen Konditionierung von zytokininduzierten Immunreaktionen, aber aufgrund der kleinen Fallzahlen stellen sie keinen Beweis dafür dar (Longo et al. 1999).

1.4.2 Allergische Reaktionen und Autoimmunerkrankungen

Ein anderes alltägliches Beispiel für klassische Konditionierung findet sich im Bereich der Pollenallergiker. Bei einigen dieser Patienten führt das Bild eines Heufeldes zum Auftreten der klassischen Symptome wie Niesen und Augenjucken. Dies bedeutet, dass die Patienten den Anblick der Getreidefelder mit der negativen Wirkung der als Allergen bekannten Pollen assoziiert haben und darauf konditioniert sind (Ader & Cohen 2001).

Im Bereich der allergischen Reaktionen gab es einige experimentelle Studien am Menschen. So versuchten Gauci et al. (1994) im Sinne des Geschmacksaversionsparadigma ein neuartiges Getränk (CS) mit der gleichzeitigen

Gabe von Allergenen (UCS) zu konditionieren. Als Parameter der zunächst unkonditionierten Reaktion auf die Allergene und später als konditionierte Reaktion galt die quantitative Menge der Mastzelltryptase im Nasensekret. Die positiven Resultate verdeutlichen den Einfluss der Konditionierung in diesem klinischen Bereich (Gauci et al. 1994).

Schon in den frühen 1980er Jahren gab es die ersten Studien zu konditionierten allergischen Reaktionen. Smith et al. (1983) untersuchten die allergische Reaktion des verzögerten Typs anhand von Tuberkulintests. Mehrmals wurden Tuberkulinantigene mit einer roten und Kontroll-Kochsalzinjektionen mit einer grün-markierten Spritze injiziert. An dem Testtag waren die Inhalte der farblich markierten Spritzen vertauscht worden und eine als mit Placebo assoziierte grün-markierte Ampulle, die Tuberkulin enthielt, führte zu einer abgeschwächten Hautirritation. Die Kochsalzinjektionen aus der roten Spritze bewirkten hingegen keine Hautreaktionen (Smith & McDaniel 1983). Booth versuchte 1995 in einer nach dem Konzept von Smith konzipierten Studie dessen Ergebnisse zu replizieren und durch mehrere Untersuchungen zu verifizieren. Leider führten seine Resultate zu keiner konsistenten Veränderung im Sinne einer Konditionierung (Booth et al. 1995).

Im Bereich der Autoimmunerkrankung ist von einem interessanten klinischen Einzelfall zu berichten (Olness & Ader 1992). Er beschreibt einen Patienten, der an systemischem Lupus erythematodes leidet. Die Medikation bestand in Cyclophosphamid. Die Verabreichung von Cyclophosphamid (UCS) erfolgte im Rahmen dieses Experimentes als im Geschmack (Leberöl) und Geruch (Rosenaroma) verändert (CS). Nach einigen CS-UCS Paarungen bekam der Patient zwischen seinen Behandlungen mit Cyclophosphamid einen Placebo, der die beschriebenen geschmack- und geruchlichen Veränderungen aufwies. Dies bewirkte, dass in den nächsten Monaten die klinische Behandlung des Lupus erythematodes nur 6 anstatt wie klinisch standartisiert 12 Cyclophosphamidgaben bedurfte.

Eine andere klinische Studie beschäftigte sich wiederum mit der möglichen Konditionierung des immunsuppressiven Effekts von Cyclophosphamid als UCS. Allerdings litten hier die 10 Patienten an Enzephalitis disseminata. Die mehrmalige CS-UCS Paarung und anschließende alleinige Darbietung des konditionierten Stimulus (CS, einem neuartig schmeckendem Getränk) bewirkte ebenfalls eine

Verminderung der peripheren Leukozyten, wie sie als Wirkungsweise des Cyclophosphamid beschrieben wird (Giang et al. 1996).

1.5 Biologische Relevanz der konditionierten Effekte auf das Immunsystem

Vor dem Hintergrund der großen Bandbreite der Konditionierungsstudien von Tieren zeigt sich, dass sich nur verhältnismäßig wenige Studien mit der biologischen Relevanz und dem möglichen Einsatz im klinischen Alltag der immunmodulatorischen Konditionierung auseinandergesetzt haben. Beispielhafte Einsatzorte fanden sich in der Transplantationsmedizin oder auch bei autoimmunen Prozessen.

1.5.1 Transplantationsmedizin

Die Arbeitsgruppe von Gorczynski beschäftigte sich mit dem Gedanken, ob sich die Abstoßungsreaktion eines Hauttransplantats an Mäusen durch Konditionierung beeinflussen lässt (Gorczynski 1990). Sie setzten Cyclophosphamid als unkonditionierten Stimulus (UCS) und Saccharin als konditionierten Stimulus (CS) ein. Durch die Konditionierung konnte eine signifikant verlängerte Abstoßungszeit des Hauttransplantates gegenüber der unkonditionierten Kontrollgruppe erreicht werden.

Weitergehende Studien im Bereich der Organtransplantation fanden mit heterotopen Herztransplantaten bei Rattenstämmen statt (Grochowicz et al. 1991). Basierend auf den klinischen Einsatz von Cyclosporin A in der Transplantationsmedizin untersuchte die Arbeitsgruppe um Exton, ob eine konditionierte Immunsuppression die Abstoßung eines transplantierten Herzens in das Abdomen der Tiere hinauszögern kann (Exton et al. 1999). Wie auch schon in Arbeiten von der Gruppe um Grochowicz 1991 gezeigt, verlängerte sich die Überlebenszeit des Spenderherzens signifikant durch die alleinige Reexposition mit dem Saccharin. Diese Zeitspanne konnte in einer Nachfolgestudie mit zusätzlichen subtherapeutischen Cyclosporin A Gaben soweit maximiert werden, dass nach 100 Tagen noch 20 % der Tiere eine voll funktionsfähiges Spenderherz implantiert hatten.

1.5.2 Autoimmunerkrankungen

Aber auch in anderen klinischen Gebieten ließen sich Erfolge mit konditionierter Immunmodulation verzeichnen, so zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis und dem systemischen Lupus erythematoses (SLE).

Bei Ratten gibt es eine genetische Prädisposition für eine dem SLE beim Menschen ähnelnde Autoimmunerkrankung, die unbehandelt letal verläuft. Bei diesen Tieren konnte durch die Konditionierung mit dem Immunsuppressivum Cyclophosphamid und Saccharin ein deutlich späterer Ausbruch der Erkrankung und eine Verlängerung der Überlebenszeit der Ratten gegenüber der unkonditionierten Kontrollgruppe erreicht werden (Ader & Cohen 1982).

Im Bereich der rheumatoiden Arthritis, bei Ratten künstlich hervorgerufen durch Injektion des Freund'schen Adjuvants, ist bekannt, dass unter der Behandlung mit Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid oder Cyclosporin A die Entzündung eindämmbar ist. Die Paarung dieser Substanzen (UCS) mit einer Saccharin-Vanille-Lösung (CS) führte zu einem deutlich erkennbaren Rückgang der Entzündungen, was sich durch alleinige Gabe des CS ebenfalls erreichen ließ (Klosterhalfen & Klosterhalfen 1983, Klosterhalfen & Klosterhalfen 1990).

1.5.3 Konditionierung vor dem Hintergrund klinischer Situationen

Wie schon im Kapitel zu den Konditionierungen beim Menschen aufgezeigt, gibt es einige wenige Studien, die sich mit der Erprobung der Klassischen Konditionierung bei Krankheitsbildern in klinischer Umgebung beschäftigt haben. Die divergierenden Ergebnisse sind vor dem Hintergrund kleiner Fallzahlen und vor der ethisch nicht vertretbaren Bildung einer Placebogruppe, die trotz bekannter Erkrankung auf eine medikamentöse Behandlung verzichten müsste, zu diskutieren. Auch ist aus den zahlreichen tierexperimentellen Studien bekannt, dass durch Konditionierung der gewünschten, meist immunsuppressiven Effekte nicht der Wirkungsgrad erreicht werden kann, den eine medikamentöse Therapie hervorruft (Exton et al. 2000). Allerdings kann eine Reduktion der Medikamentenapplikation bei maximaler Wirkungsweise mit Unterstützung durch die Klassische Konditionierung bewirkt und zusätzlich können unerwünschte Arzneimittelwirkungen vermieden werden. Es ist auch darauf hinzuweisen, dass eine konditionierte Immunmodulation die Entstehung und Progression von Erkrankungen nachhaltig beeinflussen kann (Olness & Ader 1992, Exton et al. 2000).

1.6 Fragestellung

In der Psychoneuroimmunologie ist die Klassische Konditionierung von immunmodulatorischen Effekten, sowohl der humoralen als auch zellulären Immunabwehr möglich und mit zahlreichen unkonditionierten Stimuli repliziert worden. Im Verhältnis zu dieser großen Anzahl von tierexperimentellen Versuchen gibt es nur wenige Konditionierungen immunologischer Effekte beim Menschen. Gerade wenn diese Versuche sich mit Situationen des klinischen Alltages beschäftigen, liegen nur geringe Fallzahlen und ein unzureichend kontrollierter Versuchsaufbau vor.

Ziel der präsentierten Studie ist die quantitative Erfassung immunsuppressiver Effekte der Klassischen Konditionierung beim Menschen.

Auf der Grundlage des Geschmacksaversionsparadigmas wurde die Studie in einem doppelblinden-placebokontrolliertem Design konzipiert. In der Konditionierungsphase erhielten gesunde männliche Probanden wiederholt innerhalb einer Woche entweder das Immunsuppressivum Cyclosporin A oder Placebo in Kombination mit einem neuartigen Getränk. In der einwöchigen Reexpositionphase bekamen alle Probanden das neuartige Getränk in Kombination mit Placebo präsentiert. Zur Darstellung der Wirkung der CsA-Applikation auf der einen Seite und als Hinweis für die erfolgreiche Konditionierung immunologischer Funktionen auf der anderen Seite wurde das Blut der Probanden an vier Messzeitpunkten immunologisch, endokrinologisch und molekularbiologisch auf funktionelle und absolute Veränderungen im Immunsystem und zur Abschätzung von Stresseffekten oder möglichen Mechanismen der Vermittlung der Konditionierung untersucht.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit dem Teilaspekt der Studie bezüglich der Auswirkung der Klassischen Konditionierung immunsuppressiver Effekte auf die Lymphozytenzirkulation und Zytokinproduktion immunologisch relevanten Zellen.

2 Studienprotokoll und Methode

2.1 Probanden

Insgesamt nahmen 34 gesunde Männer zwischen 18 und 40 Jahren (Mittel: $26,8 \pm 4,2$ Jahre) an der Studie teil, die über Aushänge an dem Uniklinikum Essen rekrutiert worden waren.

In einem Informationsgespräch wurden alle Versuchspersonen ausführlich über die Studie und ihre Ziele sowie die Wirkungsweise und möglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen des Medikaments aufgeklärt und sie gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme. Für jeden Probanden wurde eine Versicherung in Höhe von 1 000 000,- DM abgeschlossen. Ferner erhielten die Probanden nach Abschluss der Studie eine Aufwandsentschädigung von 1000 DM.

Die Studie war der Ethikkommission des Universitätsklinikum Essen vorgelegt und von dieser genehmigt worden.

Die Probanden wurden vor Beginn der Studie in der Abteilung für Innere Medizin des Klinikums (Dr. med. Canbay) auf Vorerkrankungen und anderen den Ausschlusskriterien entsprechenden Befunden klinisch untersucht.

Als Ausschlusskriterien galten Allergien gegenüber des verwendeten Pharmakons, Cyclosporin A, kardiovaskuläre, hämato-, hepato- oder nephrologische Erkrankungen, sowie die Anamnese einer Atemwegs- oder Suchterkrankung. Auch die Teilnahme an einer anderen pharmakologischen Studie in den letzten drei Monaten führte zum Ausschluss.

Die Probanden wurden auch nach Abschluss der Studie erneut umfassend internistisch untersucht.

2.2 Versuchsgruppe

Vor Beginn der Studie erfolgte die Randomisierung der Probanden nach dem Zufallsprinzip in eine Experimentalgruppe mit 18 Versuchspersonen, die als Verum Cyclosporin A in der ersten Woche und Placebo in der zweiten Woche der Studie erhielten. Die Kontrollgruppe umfasste 16 Personen, die über den ganzen Studienzeitraum hinweg Placebokapseln bekamen. Die Gruppendarstellung für die Versuchspersonen lautete hingegen, dass sie – falls Proband der Verumgruppe - Cyclosporin A entweder in der ersten oder aber auch in der zweiten Woche zugeteilt

bekommen könnten und sie in der jeweiligen anderen Woche Placebokapseln bekämen. Dies sollte etwaige Spekulationen über die Gruppenzugehörigkeit der Probanden reduzieren. Dr. M. Exton - als an der Studie nicht beteiligter Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Psychologie - vollzog die Randomisierung. Nach Abschluss der Studie wurden die Probanden gebeten, ihre jeweilige Gruppenzugehörigkeit einzuschätzen.

Die Probandenkontakte fanden in zwei abgeschirmten Räumen statt, um störende akustische und optische Reize zu eliminieren und durch den Wechsel der Räume eine Konditionierung auf die Umgebung zu verhindern.

2.3 Der konditionierte Stimulus

In zahlreichen Tierexperimenten hat sich Konditionierung mit einer für das Tier neuartigen Substanz als konditionierter Stimulus etabliert (Exton et al. 1998c). Diese erfolgreichen Versuche nach dem Geschmacksaversionsparadigma bilden die Grundlage für die hier dargestellte Studie der Humankonditionierung.

Um als konditionierten Stimulus einen möglichst neuartig und ungewöhnlich schmeckenden Reiz zu verwenden, wurden 9 verschiedene Getränke in Voruntersuchungen an 31 Personen getestet. Diese hatten die Aufgabe, die Getränke aufgrund der Kriterien Geruch, Geschmack, Aussehen und Neuartigkeit zu beurteilen. Auf Grundlage dieser Vorversuche wurde das geeignete Getränk ermittelt.

Das Getränk bestand aus 150 ml Erdbeermilch, versetzt mit 2 Tropfen naturreinem Lavendelöl (Aromara). Zur optischen Entfremdung färbten wir das Gemisch mit 5 Spritzern grüner Lebensmittelfarbe (Caesar & Loretz) an.

Die Probanden wurden gebeten, anderthalb Stunden vor der Testung und zwei Stunden danach Nahrungs- und Nikotinkarenz einzuhalten. Ihnen war allerdings erlaubt, Kohlensäureversetztes Mineralwasser *ad libitum* zu sich zu nehmen.

Die Nahrungskarenz gepaart mit dem vermehrten Aufstoßen aufgrund der Kohlensäure bewirkte eine kontinuierliche Geschmackspräsenz innerhalb der nächsten Stunden. Deren Bedeutung erklärt sich durch die optimale zeitliche Kontingenz von CS und UCS. Aus der Literatur ist bekannt, dass die maximale Konzentration des Cyclosporin A im Blut zwei Stunden nach Applikation eintritt (Lison 1998).

2.4 Cyclosporin A als unkonditionierter Stimulus

2.4.1 Hintergrund und Wirkungsweise

Cyclosporin A ist ein neutrales Polypeptid, das um 1970 unter der Leitung von J.F. Borel entdeckt wurde. Die Substanz ließ sich aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* isolieren. 1972 erkannte Borel die eindrucksvolle immunsuppressive Wirkung des Stoffes im Gegensatz zu den bis dahin üblichen Immunsuppressiva Azathioprin und Steroiden. 1978 führten Calne und Powels erste erfolgreiche tierexperimentelle Organtransplantationen und Verminderung der Graft-versus-Host-Reaktion mit CsA durch (Borel 2002).

Klinische Einsatzpunkte dieses Immunsuppressivums sind vor allem in der allogenen Transplantationsmedizin zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen und bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Psoriasis zu sehen. Mit Vorzügen wie die reversible immunologische Wirkung und die geringe toxische Wirkung auf das Knochenmark lässt es sich leichter handhaben als andere Zytostatika.

Der Angriffspunkt des Immunsuppressivums liegt in der zellulären Abwehr. Es wirkt spezifisch in den T-Lymphozyten, wo es sich an einen zytosolischen Rezeptor (Cyclophyllin) anlagert. Dieser Komplex hemmt das Enzym Calcineurin, eine Proteinphosphatase. Dieses Enzym hat eine Schlüsselfunktion bei den Vorgängen in den T-Lymphozyten, die sich an die Antigenerkennung anschließen. Calcineurin ist an der Induktion der Bildung verschiedener Interleukine, wie vorwiegend Interleukin-2, beteiligt, weil es einen Transkriptionsfaktor (NF-AT) durch Dephosphorylierung permeabel für die Zellmembran macht. Diese Wirkung in Kombination mit der zusätzlichen inhibierenden Wirkung des CsA auf die Proteinkinase C β , über die nukleäre Komponenten des NF-AT induziert werden, verhindern eine Transkription des Interleukin-2-Gens (Resch & Szamel 1997).

Bei reduziertem Interleukin-2 können Antigen-aktivierte T-Lymphozyten nicht proliferieren, was zu einer reversiblen Hemmung des Immunsystems führt (Lüllmann & Mohr 2001).

Darüber hinaus hemmt Cyclosporin A die Bildung von Interferon- γ , welches ebenfalls für die Aktivierung, Wachstum und Differenzierung der T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt (Burmester & Pezzutto 1998).

2.4.2 Applikation

In Vorversuchen mit 3 Probanden wurde die Menge an Cyclosporin A pro kg Körpergewicht ermittelt, die nötig war, um einen ausreichenden Blutspiegel mit entsprechend gut abgrenzbarer Wirkungsweise des CsA zu den unter den jeweiligen Untersuchungsmethoden normwertigen Reaktionen, zu erreichen. Nach nicht hinreichender Wirkung bei der Gabe von 1,25 mg/kg Körpergewicht wurde die Dosis verdoppelt. Unter der Gabe von 2,5 mg/kg Körpergewicht wurden sehr gute Ausgangswerte in den einzelnen Untersuchungen ermittelt, die diese Konzentration als hinzureichend hoch für diese Studie definierten. Zum anderen wurde im Hinblick auf die Probanden der Spiegel niedrig genug gehalten, um langfristige unerwünschte Arzneimittelwirkungen ausschließen zu können. Die Dosierung entspricht einer üblichen Erhaltungsdosis bei transplantierten Patienten.

Die Versuchspersonen erhielten Cyclosporin A (Sandimmun, Schering), in Form von Gelkapseln. Als Dosierungsgrößen standen uns 10, 25, 50 und 100 mg Kapseln zur Verfügung. Die Kapseln bekamen zusätzlich eine Gelatinekapsel als Außenhülle. Die Herstellung dieser Hüllen erfolgte von der Apotheke des Klinikums Essen, ebenso wie die Herstellung von identisch aussehenden Placebokapseln, die allerdings eine Glukosefüllung enthielten. Dies brachte die Voraussetzung für eine optimale Versuchsdurchführung im Sinne einer Doppelverblindung, da weder der Versuchsleiter noch der Proband Verum- von Placebokapseln unterscheiden konnte. Die Versuchspersonen der Experimentalgruppe erhielten eine Dosierung von 2,5 mg/kg Körpergewicht insgesamt viermal im Abstand von 12 Stunden.

Da gewisse Nahrungsmitteln wie z.B. Grapefruitsäfte oder Alkohol mit Cyclosporin A interagieren, wurden die Probanden auf den Verzicht dieser Stoffe während der Studie hingewiesen (Rote Liste 2003).

2.5 Studienablauf

Konditionierung und Reexposition

Der Studienablauf umfasste zwei Wochen, wobei die erste Woche der Konditionierung und die zweite Woche der Reexposition diente.

Während der Konditionierungsphase erhielten die Probanden der Verumgruppe am Abend des ersten Tages und noch weitere dreimal im Abstand von 12 Stunden bis zum Vormittag des dritten Tages Cyclosporin A-Kapseln, die sie mit Hilfe der gesamten Menge des neuartig schmeckenden Getränks zu sich nehmen mussten.

Diese Prozedur wiederholte sich als Reexposition in der zweiten Woche an den gleichen Wochentagen zu den gleichen Uhrzeiten, nur diesmal erfolgte die Gabe des Getränks zusammen mit Placebokapseln.

Die Probanden der Placebogruppe hingegen nahmen während des ganzen Ablaufs Placebokapseln gemeinsam mit dem Getränk zu sich.

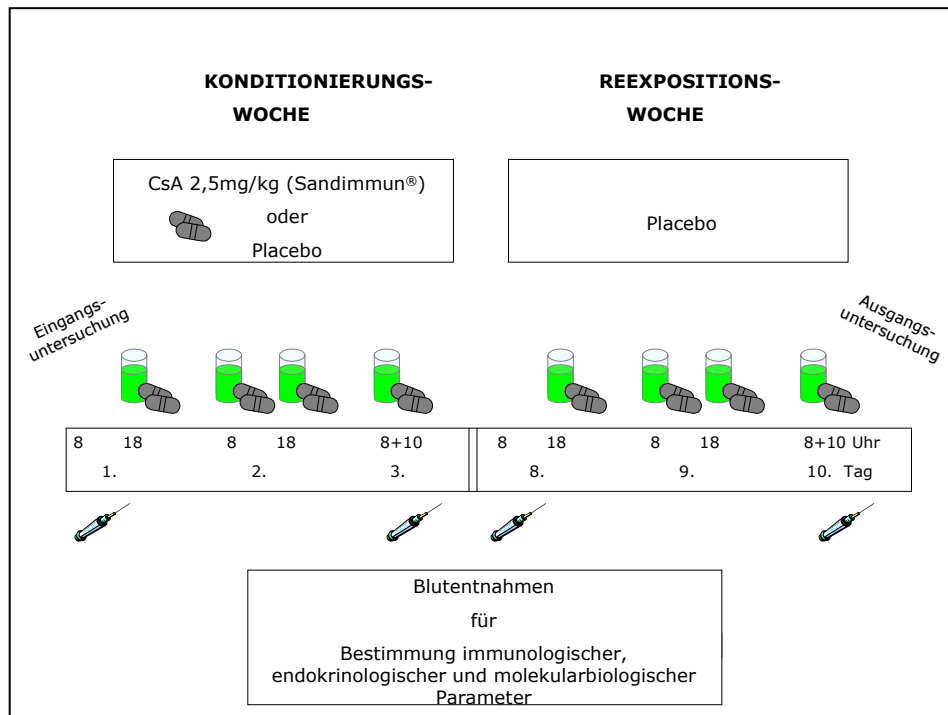


Abbildung 2.1: Graphische Übersicht des Studienablaufs

Messzeitpunkte

Am Morgen des ersten Studientages fand die erste venöse Blutentnahme von 60 ml noch vor der ersten CS-UCS Paarung zur Ermittlung der Ausgangswerte statt. Ebenso erfolgte am dritten Tag sowie am letzten Studientag 2 Stunden nach der letzten Konditionierung bzw. Reexposition eine Blutentnahme vom gleichen Umfang. Bei 21 der 34 Probanden wurde auch zu Beginn der Reexposition, also am Morgen des 8. Studientages, Blut zur Überprüfung der residualen CsA-Konzentration und zur Klärung der möglichen anhaltenden Wirkung des Immunsuppressivums durch die Applikation in der ersten Woche, entnommen.

Bestimmung des Cyclosporin-Vollblutspiegel

Die Bestimmung des CsA-Vollblutspiegels erfolgte am letzten Tag (3.Tag) der Konditionierungswoche einmal vor der CS-UCS Paarung für den Talspiegel (8 Uhr) und ebenso 2 Stunden nach der Paarung (10 Uhr) für den Maximalspiegel (nach

(Lison 1998). Entsprechend wurde auch in der Reexpositionswuche gehandelt, um die Probanden nicht durch wechselnde Blutentnahmemengen zu Spekulationen anzuregen.

Bei jeder Blutabnahme wurden Herzfrequenz in Schläge pro Minute und Blutdruckwerte indirekt nach dem Riva-Rocci Verfahren in mm Hg protokolliert.



Abbildung 2.2:
Gabe von Kapseln (CS)
und Getränk (UCS)

Subjektive Beurteilung des Getränks

Bei jeder CS-UCS Paarung wurden die Probanden gebeten, das Getränk aufgrund der Kriterien Geruch, Geschmack und Neuartigkeit auf einer 9-stufigen Skala zu beurteilen.

Methodenübersicht

Zu den einzelnen Messzeitpunkten wurde das Vollblut in mehreren immunologischen, molekularbiologischen und endokrinologischen Untersuchungsmethoden untersucht. Ziele dieser Methoden waren die Darstellung der Effekte des Cyclosporin A in der Konditionierungswoche und der konditionierten Effekte in der Reexpositionswuche durch alleinige Gabe des neuartigen Getränks mit Placebokapseln in der Verumgruppe im Vergleich zu einer Placebogruppe.

Das Lymphozytenproliferationsassay, die Expression der mRNA relevanter Zytokine und einige endokrinologische und psychologische Parameter sind in den Arbeiten von M. Goebel (Goebel 2003) und J. Steiner ausführlich dargestellt und dienen dieser Arbeit als Unterstützung der dargestellten Ergebnisse.

2.6 Immunologische Parameter

2.6.1 Differentialblutbilder

2,7 ml venösen EDTA-Blutes dienten der Bestimmung der absoluten Leukozytenzahlen und des Differentialblutbildes. Die Zählung der Leukozyten erfolgte automatisch mittels eines STKS Counters (Beckmann Coulter Counter Electronics) in der Abteilung für Hämatologie des Universitätsklinikums Essen.

2.6.2 Isolation peripherer Blutlymphozyten

Die Auftrennung des Blutes in seine zellulären Bestandteile erfolgte in einer Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (Seromed) als Trennlösung. Hierzu wurde heparinisiertes Blut zu gleichen Anteilen mit PBS (phosphat buffered saline, Apotheke des Uniklinikums Essen) verdünnt und auf einen Anteil Ficoll geschichtet.

Die Dichte des Ficolls war so gewählt, dass es eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen, aber eine geringere als die Granulozyten und Erythrozyten besaß, so dass nach Zentrifugation von 18 min bei 2200 rpm sich typische Banden in dem Röhrchen gebildet hatten. In der weißlichen Interphase zwischen dem wässrigen Ficoll und dem gelblichen Serum befanden sich die Lymphozyten und Monozyten. Die Interphase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und mit PBS bei einer Zentrifugation von 1700 rpm über 12 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Medium R10 ((RPMI Medium 1640 (Seromed, Berlin), 10% FCS (Seromed), Pennstreb, Glutamin (Sigma, Taufkirchen)) aufgenommen.

Zur Zellzählung wurden 20 µl der Zellsuspension in einer 1:20 Verdünnung mit 380 µl einer 3%igen Essigsäure-Lösung (Sigma) verdünnt, wodurch noch vorhandene Erythrozyten lysiert wurden. Die Zellen wurden in eine Neubauer-Zählkammer übertragen und mit dem Mikroskop (Olympus CK 40) bei 160facher Vergrößerung gezählt. Nach der Auszählung wurde die Zellzahl auf 2×10^6 Zellen pro ml für die weiteren Assays eingestellt.

2.6.3 Durchflusszytometrische Analysen

Zur Analyse der Lymphozytenuntergruppen und der intrazellulären Zytokinsezernierung wurden zuvor isolierte Lymphozyten und Monozyten mit Hilfe eines „Fluorescence-Activated-Cell-Sorter“ (FACSCalibur™, Becton Dickinson) untersucht.

Im Durchflusszytometer passieren die Zellen den gebündelten Strahl eines Argonlasers. Der Strahl wird dabei in Vorwärtsrichtung (FSC=forward light scatter) und Seitswärtsrichtung (SSC=sideward light scatter) abgelenkt. Spezielle Photodetektoren messen die Streuung des Laserlichts, wobei das FCS als Maß für die relative Zellgröße und das SSC für die relative Granularität bzw. Zellkomplexizität dient (Abbildung 2.3).

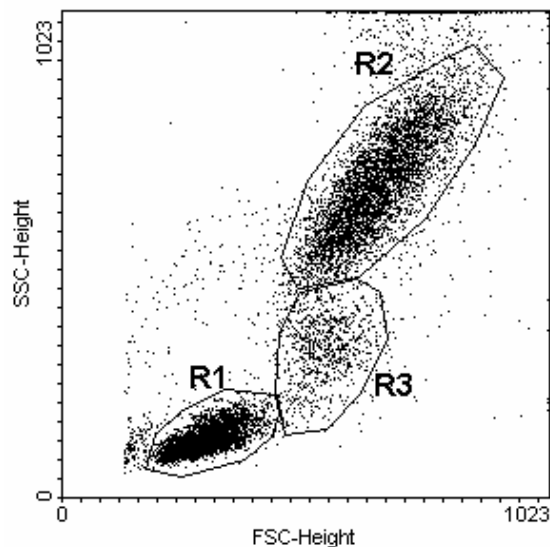


Abbildung 2.3: Darstellung einer exemplarischen Punktwolke mit dem SSC auf der Y- und dem FSC auf der X-Achse, wobei R1 der Population der Lymphozyten, R2 der Granulozyten und R3 der Population der Monozyten im Vollblut entspricht.

Wenn die Oberflächenantigene der Zellen zusätzlich mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert sind, wird dieser Farbstoff durch den Laser angeregt und emittiert je nach Farbstoff Lichtsignale von spezifischer Wellenlänge. Diese Lichtsignale werden wiederum den Photodetektoren zugeleitet und dort in elektrische Impulse konvertiert. Es ist möglich, anhand der Streuimpulse die einzelnen Subpopulationen einzugrenzen und gesondert auszuwerten.

Durch die Anfärbung der Zellen mit zwei oder drei Fluoreszenzfarbstoffen konnten unterschiedliche Antigenstrukturen der Zelle/Zytokin ausgewertet werden, was eine genaue Zelltypisierung erlaubt. Bei den verwendeten Farbstoffen handelt es sich um Fluorescein (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin Chlorophyll Protein (PerCP) (Becton Dickinson; Dako).

2.6.3.1 Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

Eine 96er Napfrundbodenplatte (Nunc) wurde in der Vorbereitung 30 min mit 200 µl Blockpuffer (PBS + 10% Kaninchenserum) auf Eis inkubiert, um eine spätere

Adhärenz der Zellen durch die Blockade von unspezifischen Bindungen an der Platte zu verhindern. Danach wurde die Platte dekantiert.

Pro Napf sind 100 µl der Zellsuspension (2×10^6 Zellen pro ml PBS) überführt und erneut 30 min mit zusätzlichen 200 µl Blockpuffer auf Eis inkubiert worden. Nach anschließender 2 min Zentrifugation bei 1300 rpm, wurden die Zellen in 50 µl Cellwash (Becton Dickinson, Heidelberg) aufgenommen und mit 3-10 µl der entsprechenden monoklonalen Antikörper gegen die jeweiligen Oberflächenantikörper markiert.

Die untersuchten Populationen waren die T-Zellen (CD3) mit Unterteilung in Helfer T-Zellen (CD3; CD4) und zytotoxische T-Zellen (CD3; CD8), sowie die Gruppen der NK- (CD16; CD56), B-Zellen (CD20) und Monozyten (CD14).

Danach wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und anschließend folgten zwei weitere Zentrifugations- und Waschschriffe (1300 rpm, 2 min).

Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 400 µl Cellwash zur Messung im FACSCalibur aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt.

Die Fluoreszenzkomensation erfolgte mit CaliBRITE beads (Becton Dickinson) und dem FACSComp Programm und die Analyse mit Hilfe des CellQuest Programms (Becton Dickinson).

Mit Hilfe des Differentialblutbilds lassen sich die durchflusszytometrischen Angaben zur relativen Verteilung der Zellpopulationen als absolute Zahlen darstellen.

2.6.3.2 Bestimmung der intrazellulären Zytokinsynthese von T-Lymphozyten *in vitro*

Nach der oben beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation wurden 2 ml einer Zellsuspension von 2×10^6 Zellen pro ml in R10 resuspendiert.

Die Zellen wurden durch Zugabe von 10 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, Sigma) und 1 µg/ml Ionomycin (Sigma) stimuliert und 1h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

Als Golgistopper wurde dem Ansatz 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma) zugegeben und erneut für 3h im Brutschrank verwahrt.

Die Zellen wurden für 12 min bei 1700 rpm zentrifugiert und in 500 µl Paraformaldehyd (ICN) fixiert. Je 50 µl der Paraformaldehydlösung pro Napf wurden auf eine 96er Rundbodenplatte überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Zellen in 150 µl PBS + BSA (0,1%, Sigma) bei 1300 rpm für 2 min gewaschen.

Nach Dekantation der Platte wurden die Zellen in 50 µl Saponin (ICN) pro Napf resuspendiert. Saponin perforiert die Zellmembran, so dass Antikörper ins Innere der Zelle gelangen können. Zusätzlich wurden die Näpfe noch mit 20 µl Blockpuffer versetzt und mit 3-10 µl der entsprechenden monoklonalen Antikörper gegen die jeweiligen intrazellulären Zytokine und Oberflächenantigene markiert.

Die Menge der T-Lymphozyten (CD3) und ihren Subgruppen, die intrazellulär die Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ) synthetisieren, waren Ziel der Untersuchung.

Der Oberflächenmarker CD69 diente als Kontrolle des Ziels, dass alle T-Lymphozyten (CD3) aktiviert worden sind. Es ist bekannt, dass CD 69 auch „early activation antigen“ genannt bereits 30 min nach Stimulation auf den Zellen exprimiert wird und damit einen der frühesten Marker der erfolgreichen Aktivierung mit PMA und Ionomycin darstellt (Cebrian et al. 1988).

Nach 20 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit 150 µl Cellwash bei 1300 rpm für 5 min gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 400 µl Cellwash aufgenommen und im FACSCalibur mit Hilfe des CellQuest Programms (Becton Dickinson) analysiert.

2.6.4 Bestimmung der Zytokinsekretion stimulierter Lymphozyten *in vitro*

EDTA-Vollblut wurde nach einer Verdünnung von 1:10 mit RPMI versetzt mit 1% Antibiotikum und zusätzlicher Gabe von 25µg/ml Phytohemagglutinin (PHA), (ICN, Frankfurt) im Brutschrank bei 37°C und 5%igen CO₂-Gehalt inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Probe bei 4°C zentrifugiert (1400 rpm, 15 min) und der Überstand abgenommen. Dieser wurde bis zur Analyse mit kommerziell erhältlichen Tests (R&D Systems) bei - 80°C gelagert.

Diese „enzyme-linked-immunosorbent assays“ (ELISA) beruhen auf dem Prinzip der quantitativen Sandwich Technik: Eine Mikrotiterplatte mit dem zum gesuchten Antigen korrespondierenden Antikörper wurde verwendet. Vorhandene Antigene im Überstand verbanden sich mit den Antikörpern. Nach Waschen der Platte wurde ein enzymmarkierter polyklonaler Antikörper, der spezifisch mit dem gesuchten Antigen

reagiert, hinzugegeben und die überflüssige Substanz ebenfalls wieder gewaschen. Durch das Enzym wurde in der Farbreaktion Substrat umgewandelt und zwar proportional zu der Menge des initial gefundenen Antigens. Die Farbreaktion konnte nach der Erstellung einer Eichkurve direkt mit der Konzentration des gesuchten Antigens korreliert werden.

Diese Technik ermöglichte die Bestimmung der Zytokine Interleukin-2 und Interferon- γ im Überstand nach Stimulation der Zellen.

Alle Proben und Standards wurden in Duplikation gemessen. Die Detektionsgrenze lag bei 7 pg/ml für IL-2 und bei 8 pg/ml für IFN- γ . Die Intraassayvarianz betrug 4,3% für IL-2 und 4,7% für IFN- γ . Die Interassayvarianz lag bei 10,0% für IL-2 und 7,8% für IFN- γ .

2.7 Endokrinologische Parameter

Bestimmung der Kortisolkonzentrationen

Die EDTA-Vollblutproben wurden bei 4°C für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das abgenommene Plasma bis zur Weiterverwertung bei - 80°C gelagert.

Die Analyse der jeweiligen Hormonkonzentrationen übernahm die Abteilung für Endokrinologie des Universitätsklinikums Essen mit Hilfe kommerzieller Immunoassays (Automatisches Chemilumineszenz-System ACS:180 Cortisol +E, Bayer) unter Anwendung der Chemilumineszenz.

Dieses Assay beruht auf der Bindung des Kortisols in einem Sandwich-Komplex mit einem durch Chemilumineszenz-Acridinium-Ester markierten Antikörper. Im Luminometer wird die Lumineszenzreaktion am Acridinium-estermarkierten Kortisol ausgelöst und quantifiziert. Die Menge an gebundenem, markiertem Antikörper ist direkt proportional zur Konzentration von Kortisol in der Probe.

Die Intraassayvarianz betrug weniger als 7%, die Interassayvarianz lag bei weniger als 9,0%.

2.8 Messung des Cyclosporin A-Spiegels im Blut

Zur Bestimmung des Cyclosporin A-Spiegels wurden den Probanden 2,7 ml venösen Blutes in eine EDTA-Monovette abgenommen und von der Abteilung für Pharmakologie des Universitätsklinikums Essen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (TDx, Abbott) analysiert.

Dem Test liegt das Prinzip des Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (FPIA) zugrunde. Hierbei konkurrieren ein mit Tracer (Fluoreszenzfarbstoff) markiertes Antigen mit dem Antigen der Probandenprobe kompetitiv um Bindungsstellen der Antikörpermoleküle. Die gemessene Polarisation ist umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration im Blut des Probanden.

2.9 Analyse der Daten und Statistik

Alle Berechnungen (Mittelwert und Standardabweichung, Varianzanalyse) sind mit Hilfe des Computerprogramms Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Version 9.01) durchgeführt worden. Die wiederholt durchgeführte Varianzanalyse erfolgte anhand von zwei Faktoren, Gruppe und Zeit. Die nonparametrischen Verfahren Kolomogorv-Smirnov-Test und Mann Whitney-U-Test dienten zur Prüfung der Voraussetzungen der Varianzanalyse auf Normalverteilung, während der Mauchly Sphericity-Test zur Überprüfung der Voraussetzung von Unabhängigkeit und Varianzhomogenität angewandt wurde.

Die *post hoc* Analysen erfolgten unter Verwendung von Tukey Tests und werden in den Abbildungen als Signifikanzen aus den Gruppenvergleichen in bezug auf den Messzeitpunkt angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Anamnestische Daten

Weder in ihrer durchschnittlichen Größe, dem Körpergewicht, dem Body Mass Index und dem Alter unterschieden sich die randomisiert verteilten Personen der Versuchsgruppen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Darstellung des durchschnittlichen Alters, Größe, Gewicht und Body Mass Index der Verum- und Placebogruppe

	Alter in Jahren	Größe in cm	Gewicht in kg	Body Mass Index
Verumgruppe	26.17 ± 0.89	183.24 ± 1.58	79.03 ± 1.56	23.58 ± 0.51
Placebogruppe	27.47 ± 1.21	182.07 ± 1.76	80.6 ± 2.01	24.35 ± 0.57

Selbsteinschätzung der Gruppenzugehörigkeit

Von den 18 Probanden der Verumgruppe schätzten 11 richtig ein, dass sie Cyclosporin erhalten hatten. 4 Probanden waren überzeugt, Placebo genommen zu haben und weitere 4 konnten es nicht beurteilen.

Aus der Placebogruppe dachten 9 der 16 Probanden richtig, dass sie Placebo erhalten hatten, während 4 Probanden sich fälschlicherweise der Verumgruppe zugeordnet hatten. 3 Probanden, die Placebo erhalten hatten, konnten ihre Gruppenzugehörigkeit nicht angeben.

3.2 Subjektive Beurteilung des konditionierten Stimulus

Die Probanden beurteilten das neuartige Getränk nach jeder Konditionierung und Reexposition zu den Qualitäten Geschmack, Geruch und Bekanntheitsgrad.

Qualität Geschmack

Bei der subjektiven Beurteilung des neuartigen Getränks beurteilte die Placebogruppe die Qualität des Geschmack ab der 4-ten Gabe signifikant besser als die Verumgruppe, während bei der Verumgruppe die subjektive Beurteilung konstant blieb (Abbildung. 3.1). Auch in der zweiten Woche, der Reexpositionswoche empfanden die Verumprobanden das Getränk weiterhin als weniger positiv. Signifikante Gruppenunterschiede lassen sich gegen Ende der ersten Woche ($p=.015$) und zu Beginn der Reexpositionswoche ($p=.025$) aufweisen (Abbildung 3.1).

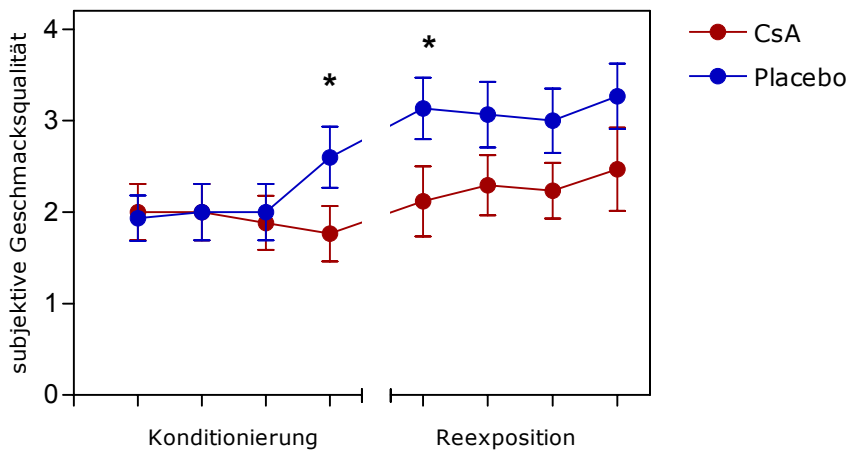


Abbildung 3.1: Mittelwerte (\pm SEM) für die subjektive Beurteilung durch die Verum- und Placebogruppe der Qualität Geschmack des konditionierten Stimulus in der Konditionierungs- und Reexpositionswoche

Qualitäten Geruch und Neuartigkeit

Bei der subjektiven Beurteilung des neuartigen Getränkes in den Qualitäten Geruch und Neuartigkeit ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und den Wochen erkennen (Abbildung 3.2 A und B).

Aber die Placebogruppe empfand tendenziell in beiden Wochen den Geruch als weniger belästigend als die Verumgruppe. Beide Gruppen zeigten eine gering abfallende Toleranz gegen diesen Geruch über die beiden Wochen hinweg. Diese Parameter erreichten in der *post hoc* Analyse keine signifikanten Werte. (Abbildung 3.2 A).

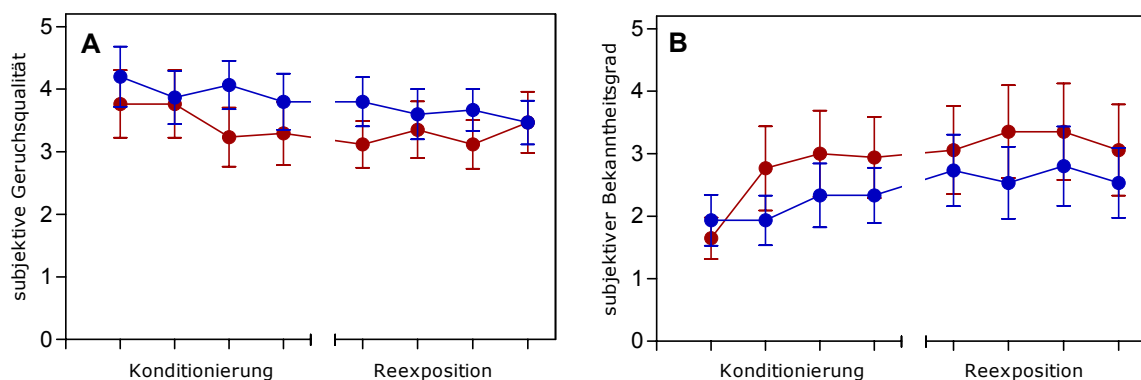


Abbildung 3.2: Mittelwerte (\pm SEM) für die subjektive Beurteilung durch die Verum (●)- und Placebogruppe (●) der Qualitäten Geruch (A) und Neuartigkeit (B) des konditionierten Stimulus in der Konditionierungs- und Reexpositionswoche

3.3 CsA-Spiegel

Vorversuche zur geeigneten Cyclosporin A Einzeldosis

In den Vorversuchen wurden die Vollblutmaximalspiegel des Cyclosporin A bei einer Einzeldosis von 1,25 mg/kg KG/12h und 2,5 mg/kg KG/12h bestimmt.

Bei der Dosis von 1,25 mg/kg KG wurde im Durchschnitt eine Maximalspiegel von 392 ng/ml und bei der doppelten Dosis ein Spiegel von 1004 ng/ml erreicht.

In der folgenden Abbildung 3.3 ist der prozentuale Anteil der Interleukin-2 synthetisierenden T-Lymphozyten (CD3) an den Gesamtlmphozyten für die beiden Dosen dargestellt. Bei einer Einzeldosis von 2,5 mg/kg KG war eine deutlich stärkere Reduktion dieser Zellpopulation zu verzeichnen. Diese Untersuchung diente exemplarisch der Ermittlung der geeigneten CsA - Einzeldosis, bzw. der hinzureichenden immunsuppressiven Wirkung.

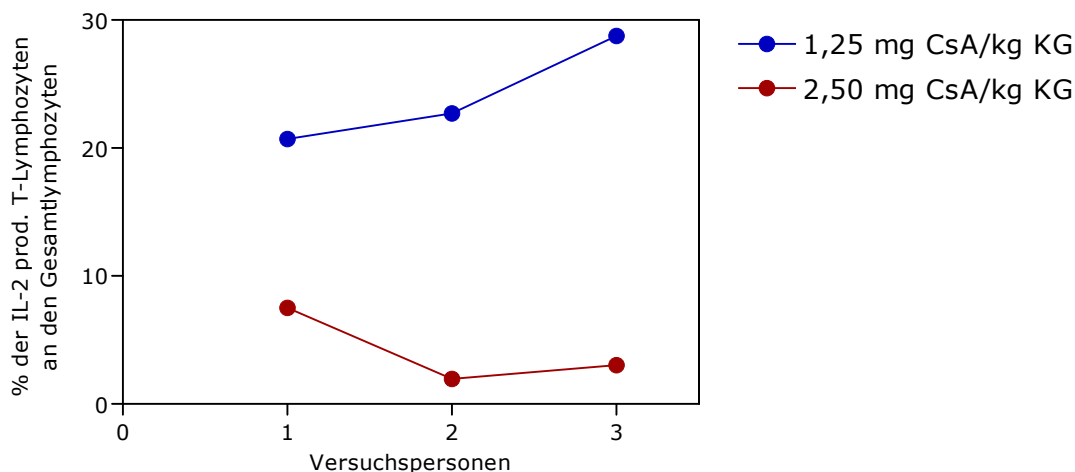


Abbildung 3.3: Prozentualer Anteil der IL-2 produzierenden T-Lymphozyten an den Gesamtlmphozyten bei einer Dosis von 1,25 und 2,5 mg/kg KG für jeden einzelnen der drei Versuchspersonen

Cyclosporin A Blutspiegel während des Studienzeitraums

Zur genauen Verlaufskontrolle der Cyclosporin A Konzentrationen im peripheren Blut wurden sowohl die Talspiegel (8 Uhr) vor CS-UCS Paarung als auch die Maximalspiegel zwei Stunden (10 Uhr) nach der jeweilig letzten Paarung der beiden Wochen gemessen. Des weiteren wurde zu Beginn der Reexpositionswoche eine Messung durchgeführt, um eine sichere Elimination des Medikamentes aus dem Blut abzuklären (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Mittelwerte (\pm SD) des CsA Plasmaspiegels in ng/ml der Verum- und Placebogruppe am Ende der Konditionierung und zu Beginn und Ende der Reexposition

	Talspiegel	Maximal- spiegel	Reexposition	
	3. Tag	3. Tag	8. Tag (N=21)	10. Tag
Verumgruppe	144,5 \pm 33,4	1109,8 \pm 217,6	<25,0	<25,0
Placebogruppe	<25,0	<25,0	<25,0	<25,0

Die Tabelle (3.2) lässt erkennen, dass nur in der ersten Woche, der Konditionierungswoche, Cyclosporin A Konzentrationen und nur bei der Verumgruppe im peripheren Blut gemessen werden konnten. Am dritten Tag der Konditionierungswoche wiesen die Probanden der Verumgruppe, die 5 mg/kg KG in zwei Einzeldosen Cyclosporin A erhielten, Werte von 80 – 200 ng/ml als Talspiegel und zwischen 718 – 1430 ng/ml als Maximalspiegel auf. Der erste Wert der Reexpositionswoche, gemessen am 8. Tag verdeutlicht, dass keine residuale Konzentrationen von Cyclosporin A zu Beginn der Reexposition vorlagen. In der zweiten Woche waren keine Cyclosporin A - Spiegel mehr zu messen.

3.4 Kardiovaskuläre Parameter

Puls und Blutdruck

Zur Kontrolle der Medikamenteneffekte und zum anderen zur Überprüfung des Stresseffektes wurden bei jeder Blutabnahme einige kardiovaskuläre Parameter wie Puls und Blutdruck protokolliert. Sie sind in der folgenden Tabelle 3.3 aufgelistet. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Herzfrequenz ($F(2,28)=1.790$, $p=.192$, Gruppeneffekt und $F(2,56)=.561$, $p=.574$, Zeiteffekt) oder des systolischen Blutdruckes ($F(2,60)=.989$, $p=.404$, Gruppeneffekt und $F(2,58)=.943$, $p=.395$, Zeiteffekt) zwischen den Gruppen und über die Zeit hinweg, weder in der Konditionierungs-, noch in der Reexpositionswoche. Einzig der diastolische Blutdruckwert zu Beginn der Studie (1. Tag) unterschied sich in der Placebogruppe signifikant vom Ende der Reexposition (10.Tag) ($p=.03$).

Die gefundenen Werte variierten stets in den physiologischen Referenzbereichen und zeigten somit während des gesamten Studienzeitraums keine pathologischen Auffälligkeiten.

Tabelle 3.3: Mittelwerte (\pm SD) der Herzfrequenz und des Blutdruckes der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (* $p \leq .05$ in *post hoc* Analyse)

		Herzfrequenz (Schläge/min)	Systolischer Blutdruck (mm Hg)	Diastolischer Blutdruck (mm Hg)
Baseline	Verumgruppe	69.1 \pm 9,9	125.1 \pm 14,8	75.4 \pm 9,9
1. Tag	Placebogruppe	63.7 \pm 10,6	129.3 \pm 10,5	* 80.6 \pm 8,3
Konditionierung	Verumgruppe	69.2 \pm 13,0	131.4 \pm 14,8	78.4 \pm 11,5
3. Tag	Placebogruppe	62.3 \pm 10,7	131.4 \pm 12,7	77.2 \pm 7,1
Reexposition	Verumgruppe	64.0 \pm 13,5	128.1 \pm 13,1	77.1 \pm 9,2
10. Tag	Placebogruppe	64.0 \pm 11,5	134.3 \pm 12,0	74.2 \pm 7,4

3.5 Immunologische Parameter

3.5.1 Differentialblutbilder

Die absoluten Leukozytenzahlen (Abbildung 3.4) zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede ($F(2,28)=.734$, $p=.399$) und Veränderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ($F(2,56)=.556$, $p=.576$).

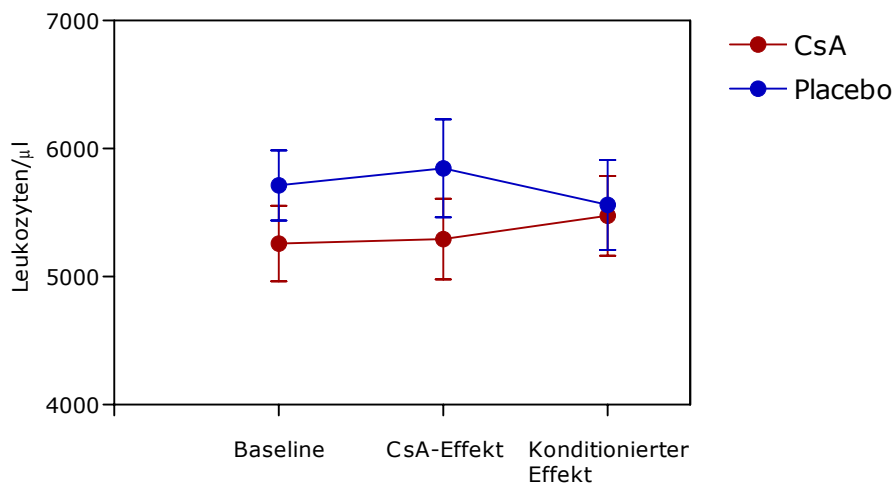


Abbildung 3.4: Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten Leukozytenzahlen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition

Des weiteren blieben auch die absoluten Granulozyten- ($F(2,54)=1.302$, $p=.280$), Lymphozyten- ($F(2,56)=2.636$, $p=.081$) und Monozytenzahlen ($F(2,60)=.989$, $p=.404$)

über den Zeitraum der Studie sowohl in der Verum-, als auch in der Placebogruppe unverändert (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Mittelwerte (\pm SD) der absoluten Granulozyten-, Lymphozyten- und Monozytenzahlen sowie deren relativer Anteil an den Gesamtleukozyten der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition

		Granulozyten (Zellen/ μ l) <i>% d. Leukozyten</i>	Lymphozyten (Zellen/ μ l) <i>% d. Leukozyten</i>	Monozyten (Zellen/ μ l) <i>% d. Leukozyten</i>
Baseline 1. Tag	Verumgruppe	3104 \pm 863 <i>58,5 \pm 6,7</i>	1706 \pm 483 <i>33,0 \pm 6,8</i>	462 \pm 177 <i>8,3 \pm 1,9</i>
	Placebogruppe	3207 \pm 686 <i>58,5 \pm 9,3</i>	1869 \pm 618 <i>32,8 \pm 9,5</i>	492 \pm 124 <i>8,6 \pm 1,5</i>
Konditionierung 3. Tag	Verumgruppe	3060 \pm 1135 <i>56,9 \pm 8,2</i>	1819 \pm 369 <i>35,3 \pm 8,8</i>	435 \pm 186 <i>7,7 \pm 1,4</i>
	Placebogruppe	3367 \pm 759 <i>61,2 \pm 6,6</i>	1761 \pm 394 <i>30,9 \pm 6,7</i>	458 \pm 151 <i>7,8 \pm 1,8</i>
Reexposition 10. Tag	Verumgruppe	3501 \pm 1207 <i>62,5 \pm 8,0</i>	1623 \pm 295 <i>29,1 \pm 7,7</i>	455 \pm 121 <i>9,1 \pm 4,7</i>
	Placebogruppe	3226 \pm 752 <i>60,9 \pm 7,1</i>	1700 \pm 444 <i>31,1 \pm 7,0</i>	443 \pm 143 <i>7,9 \pm 1,5</i>

Die gefundenen Werte variierten stets in den physiologischen Referenzbereichen und zeigten somit während des gesamten Studienzeitraums keine pathologischen Auffälligkeiten.

3.5.2 Lymphozytensubpopulationen

In der Durchflusszytometrie konnten mit Hilfe von dreifacher Fluoreszenzfärbungen die Lymphozyten und ihre Subpopulationen phänotypisiert werden. Die gewonnenen Daten zeigten die relative Verteilung und konnten anhand des Differentialblutbildes in absolute Zellzahlen umgerechnet werden.

Lymphozyten und Monozyten

In der Abbildung 3.5 sind die Lymphozyten (R1) und Monozyten (R2) als Punktwolke mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC für die relative Zellgröße) auf der X-Achse und dem Seitwärtsstreulicht (SSC für die relative Granularität) dargestellt.

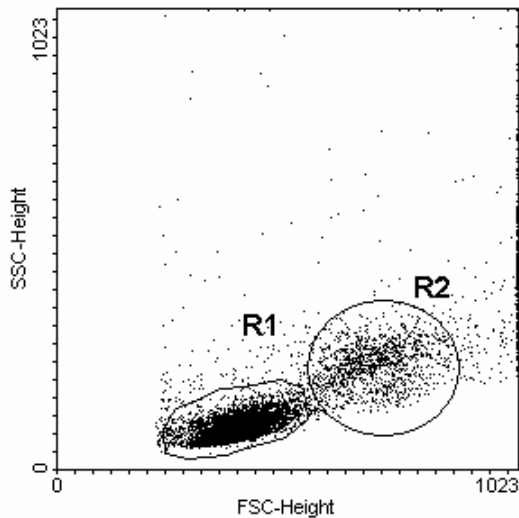


Abbildung 3.5: Populationen der Lymphozyten (R1) und Monozyten (R2) dargestellt als Punktwolken im FACS mit dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht auf X- und Y-Achse

Es war keine signifikante Veränderung in den Lymphozyten- und Monozytenpopulationen weder zwischen den Gruppen noch über den Studienzeitraum zu verzeichnen (Abbildung 3.6).

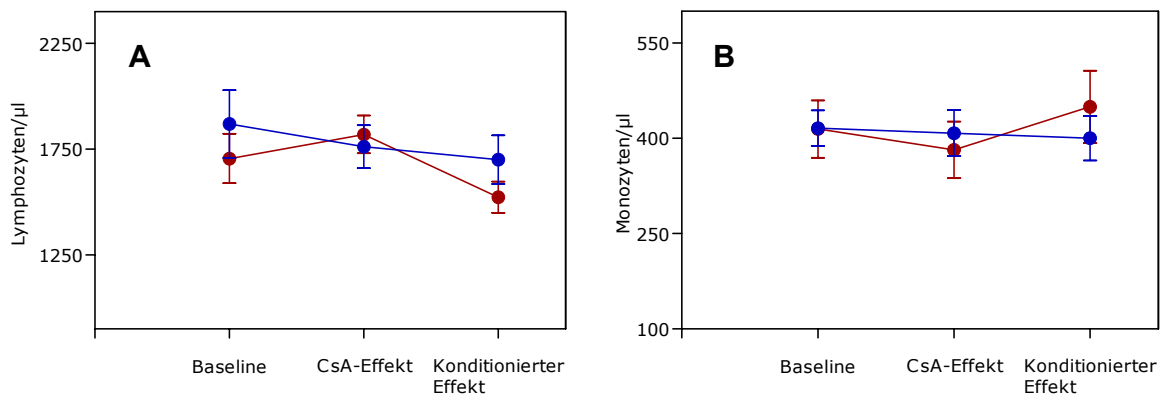


Abbildung 3.6: Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten Lymphozyten-(A) und Monozyten- (B) Zellzahlen der Verum (●)- und Placebogruppe (●) vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition

T-Lymphozyten und die Subgruppen Helfer- und zytotoxische T-Zellen

Die gezeigten Daten der absoluten T-Zellen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 3.7).

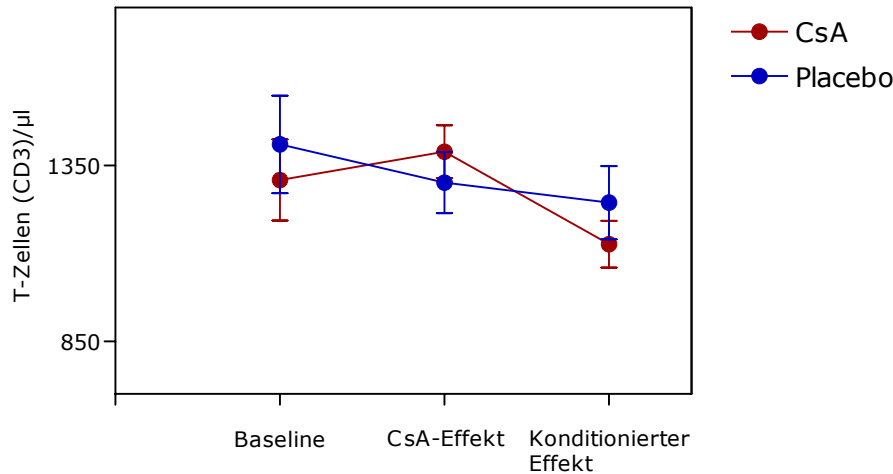


Abbildung 3.7: Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten T-Lymphozyten (CD3)-Zellzahlen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition

Auch die weitere Differenzierung in die Subgruppen Helfer (Abbildung 3.8 A)- und zytotoxische T-Zellen (Abbildung 3.8 B) ergab keinen weiteren Anhalt für eine Beeinflussung der absoluten Zellzahlen durch die Konditionierung mit Cyclosporin A oder Placebogabe.

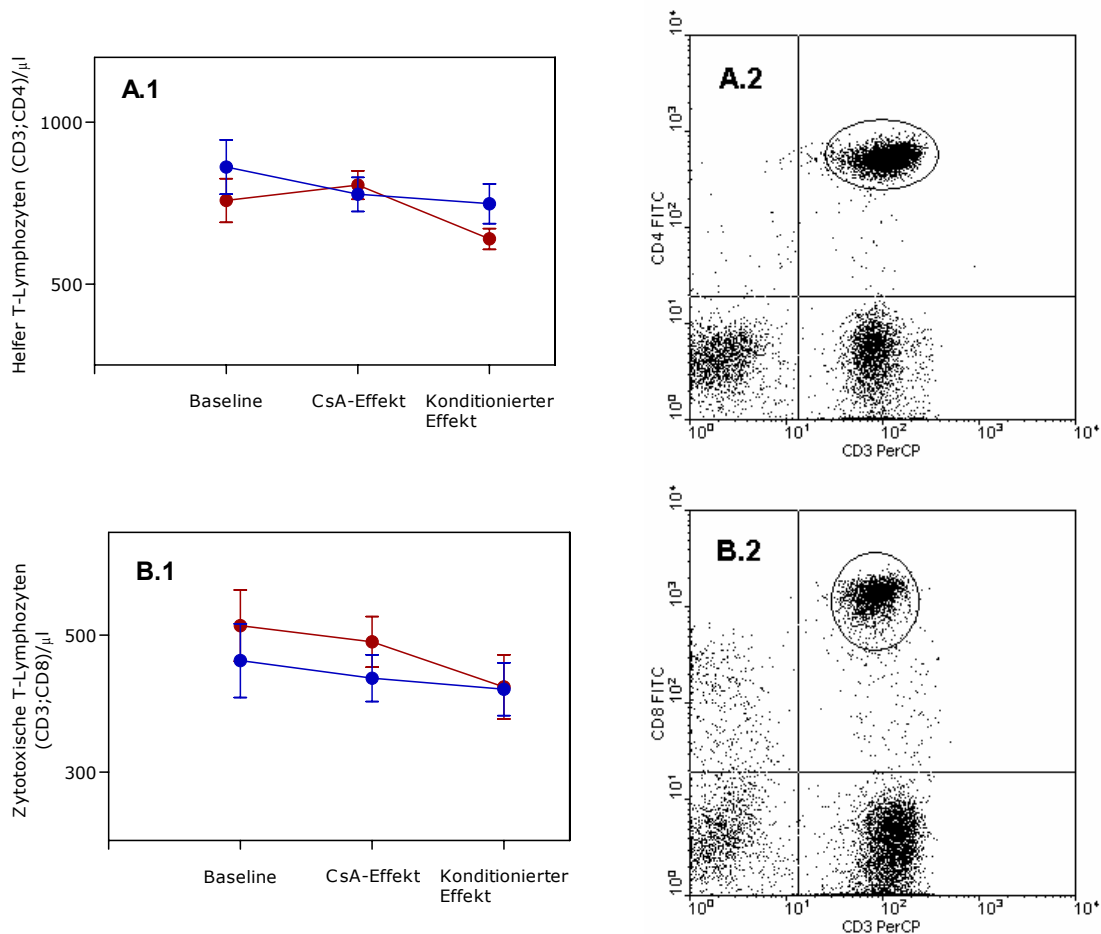


Abbildung 3.8: Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten Helfer T-Lymphozyten (CD3;CD4) (A.1)- und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD3;CD8) (B.1)- Zellzahlen der Verum (●)- und Placebogruppe (●) vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition, zusätzlich dargestellt als exemplarische Punktwolken zu einem Messzeitpunkt für die Helfer (A.2) und die zytotoxischen (B.2) T-Lymphozyten im FACS

B-Zellen und NK-Zellen

Für die Populationen der B-Zellen und NK-Zellen ließ sich weder eine relative noch eine absolute Veränderung (Abbildung 3.9 A und B) der Zellzahlen zwischen den Gruppen noch zu den einzelnen Messzeitpunkten ermitteln.

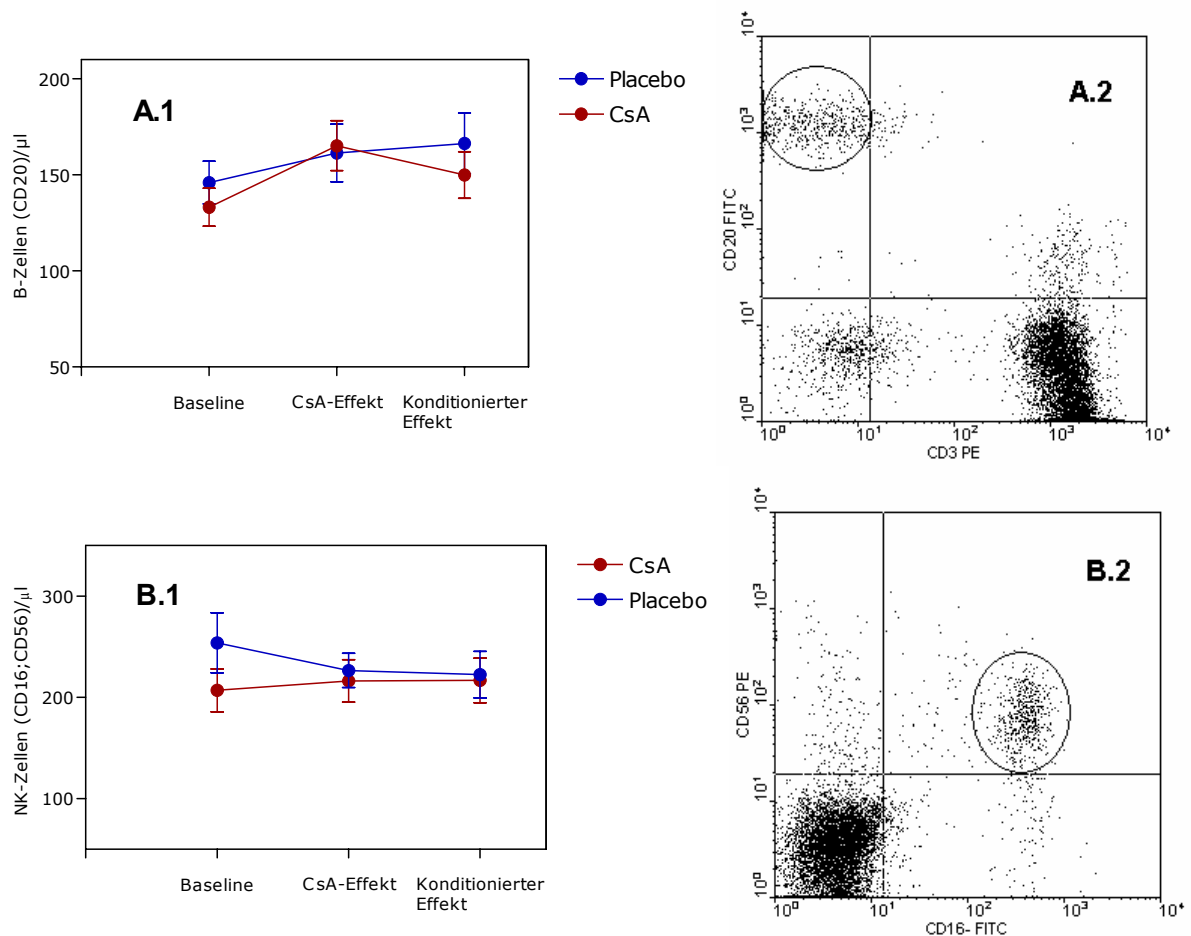


Abbildung 3.9: Mittelwerte (\pm SEM) der absoluten B (CD20) (A.1)- und NK (CD16;CD56) (B.1)- Zellzahlen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition, zusätzlich dargestellt als exemplarische Punktwolken zu einem Messzeitpunkt für die B- (A.2) und die NK- (B.2) Populationen im FACS

3.5.3 Intrazelluläre Zytokinsynthese von T-Lymphozyten *in vitro*

Nach Stimulation der T-Lymphozyten und anschließender Perforation ihrer Zellmembranen konnten mit Fluoreszenzanzfärbungen intrazelluläre Zytokine, Interleukin-2 und Interferon- γ , im FACS dargestellt werden und genau gemessen werden, wie viele der T-Lymphozyten dieser Gruppe zugeordnet waren.

Als Kontrolle der erfolgreichen Aktivierung der T-Lymphozyten (CD3) mit PMA und Ionomycin diente der Oberflächenmarker CD69, auch „early activation antigen“ genannt.

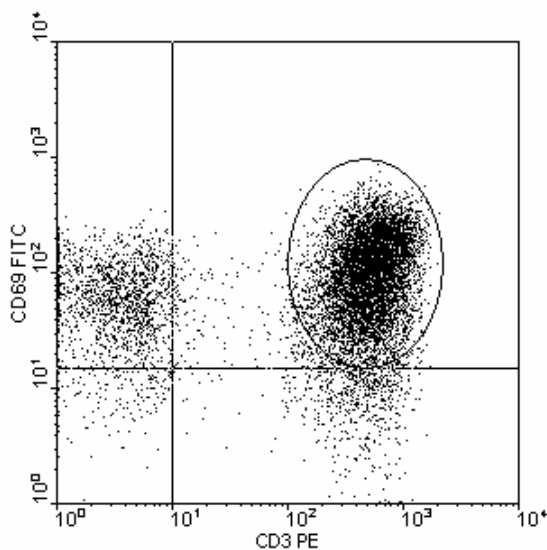


Abbildung 3.10: Exemplarische Punktvolkendarstellung der aktivierten T-Lymphozyten (CD3), erkennbar an dem exprimierten Oberflächenmarker CD69 (y-Achse) im FACS

Nach Ablesen des Status der Aktivierung wurde die jeweilige Gruppe der T-Lymphozyten (CD3) und deren Untergruppen bestimmt, die in ihrem Inneren Interleukin-2 bzw. Interferon- γ synthetisiert hatten.

Interleukin-2 Synthese der T-Lymphozyten (CD3)

Im FACS ließ sich deutlich anhand der intrazellulären Interleukin-2 Synthese der CD3-Lymphozyten die Wirkung des Cyclosporin A und der konditionierte Effekt darstellen. In Abbildung 3.11 sind exemplarisch die prozentualen Anteile der Interleukin-2 produzierenden CD3-Lymphozyten an der gesamten T-Zellpopulation als Punktvolke für eine Versuchsperson der Verumgruppe über vier Messzeitpunkte (A-D) dargestellt.

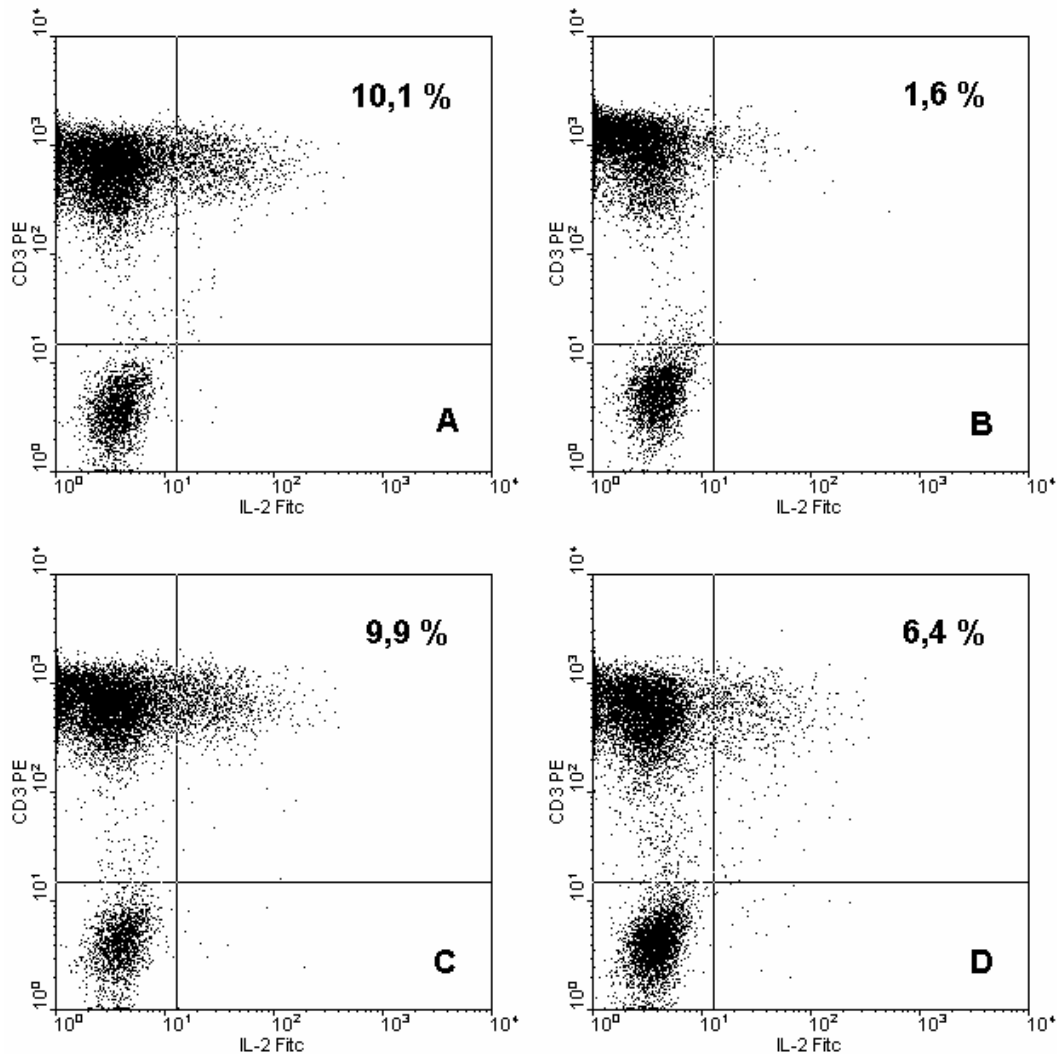


Abbildung 3.11: Exemplarische Punktwolkendarstellung der IL-2 produzierenden T-Lymphozyten (CD3) vor Beginn (A) und nach Ende der Konditionierung (B) und vor Beginn (C) und am Ende der Reexposition (D) im FACS

Die Cyclosporin A Einnahme bewirkte eine signifikante Reduktion der IL-2 Synthese aktivierter T-Lymphozyten (CD3) in der Verumgruppe ($F(2,54) = 18.4$, $p < .001$ Zeiteffekt, $F(1,27) = 8.02$, $p = .009$ Gruppeneffekt). Dieser Rückgang der Syntheserate war auch in der Reexposition durch nur die Gabe von Placebokapseln gekoppelt an das neuartige Getränk zu vermerken ($p < .01$), während zu Beginn der Reexposition ein Anstieg der IL-2 Synthese auf nahezu Werte vor Beginn der Konditionierung zu verzeichnen war.

Interleukin-2-Synthese der Helfer T-Zellen (CD3; CD4)

Die genauere Aufteilung der T-Lymphozyten in die Untergruppen Helfer und zytotoxische T-Zellen ergab für die Gruppe der Interleukin-2 synthetisierenden Helfer T-Zellen (CD3; CD4) eine signifikante Reduktion in der Verumgruppe ($F(2,52) = 12.15$, $p < .001$ Zeiteffekt, $F(1,26) = 12.9$, $p = .001$ Gruppeneffekt). Dabei ergaben die *post hoc* Analysen eine deutliche Reduktion durch CsA in der Verumgruppe ($p < .001$) und auch einen signifikanten konditionierten Effekt ohne CsA-Gabe am Ende der Reexposition ($p = .045$). Die Placebogruppe wies in keinem Punkt eine Veränderung zu den Werten vor Beginn der Konditionierung auf.

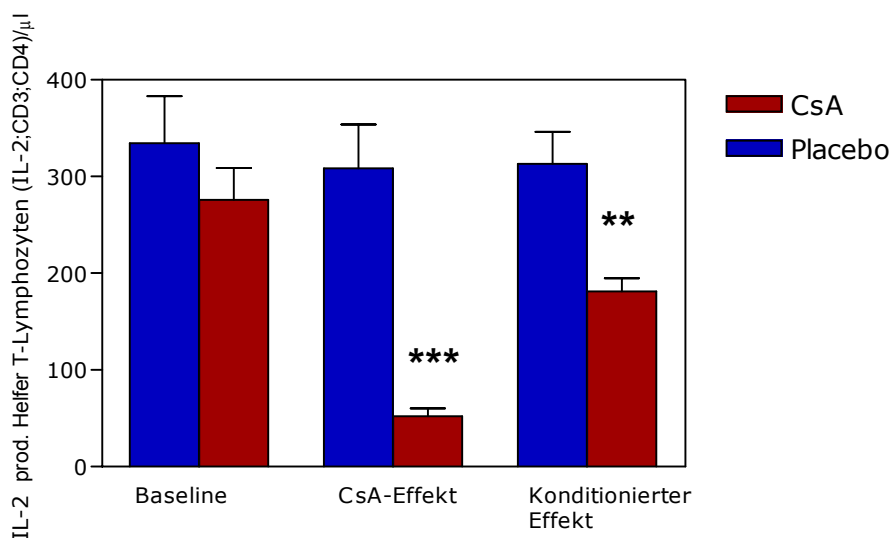


Abbildung 3.12: Mittelwerte (\pm SEM) der IL-2 synthetisierenden Helfer T-Zellen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (***, $p \leq .001$; **, $p \leq .01$ in *post hoc* Analyse)

Interleukin-2-Synthese der zytotoxischen T-Zellen (CD3; CD8)

Auch die Gruppe der IL-2 synthetisierenden zytotoxischen T-Zellen wurden durch CsA deutlich beeinträchtigt ($F(2,58) = 7.31$, $p < .001$ Zeiteffekt, $F(3,53) = 10.14$, $p < .001$ Gruppeneffekt). In der Verumgruppe war eine signifikante Reduktion nach der CsA-Gabe, die sich nach der Reexposition als konditionierter Effekt mit $p = .045$ in den *post hoc* Analysen wiederholte (Abbildung 3.13).

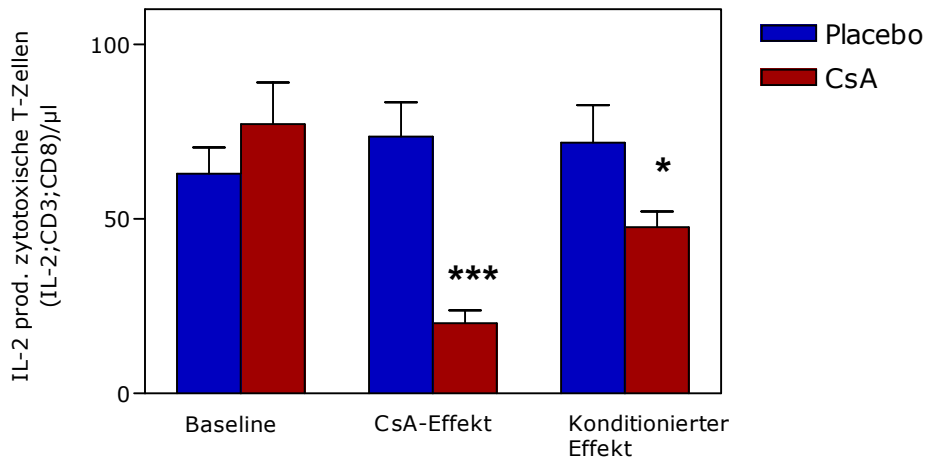


Abbildung 3.13: Mittelwerte (\pm SEM) der IL-2 synthetisierenden zytotoxischen T-Zellen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (***, $p \leq .001$; *, $p \leq .05$ in *post hoc* Analyse)

In der Abbildung 3.14 sind die IL-2 produzierenden zytotoxischen Zellen als prozentualer Anteil der Gesamtlymphozytenpopulation dargestellt mit den gleichen Veränderungen wie oben für die absoluten Zellzahlen beschrieben. Einmalig sind hier auch die Werte vor der Reexposition abgebildet, um den Rückgang der Cyclosporin A Wirkung zu Beginn der Reexposition nach der vorangegangenen Gabe in der Konditionierungswoche zu verdeutlichen.

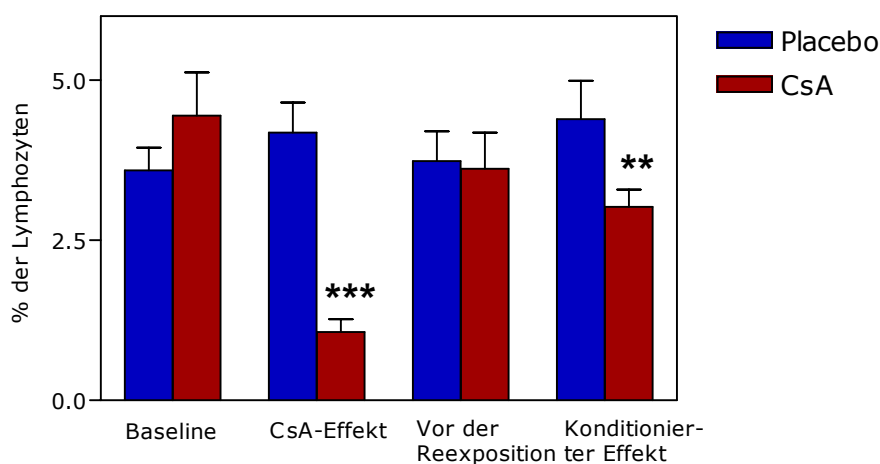


Abbildung 3.14: Prozentualer Anteil der IL-2 synthetisierenden zytotoxischen T-Zellen an den Lymphozyten der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung sowie vor und nach der Reexposition (***, $p \leq .001$; **, $p \leq .01$ in *post hoc* Analyse)

Interferon- γ -Synthese der T-Zellen (CD3)

Als zweiter Marker für die Wirkung von Cyclosporin A war wiederum Interferon- γ gewählt worden. Es ließen sich ähnliche Veränderungen wie für die Interleukin-2 Produktion verzeichnen.

Die CsA-Gabe bewirkte in der Verumgruppe eine signifikante Reduktion ($F(2,56) = 7.2$, $p = .002$). Als konditionierter Effekt ließ sich ebenfalls eine Tendenz in diese Richtung erkennen, der allerdings mit $p = .061$ in der *post hoc* Analyse keine signifikanten Werte erreichte (Abbildung 3.15).

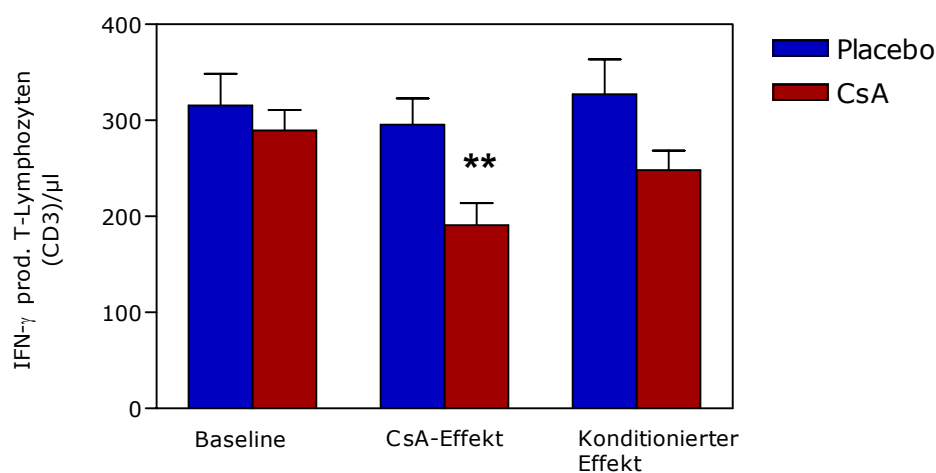


Abbildung 3.15: Mittelwerte (\pm SEM) der IFN- γ synthetisierenden T-Lymphozyten der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (**, $p \leq .01$ in *post hoc* Analyse)

Interferon- γ -Synthese der Helfer T-Zellen (CD3; CD4)

In der Subpopulation der Helfer T-Zellen ließ sich die Wirkung des CsA in der Verumgruppe und auch über den Studienzeitraum hinweg, sowohl am Ende der Konditionierung als auch am Ende der Reexposition, verzeichnen ($F(2,56) = 7.2$, $p = .002$ Zeiteffekt, $F(1,26) = 7.9$, $p = .009$ Gruppeneffekt). Die *post hoc* Analyse ergab die signifikanten Unterschiede in der IFN- γ Synthese der Helfer T-Zellen bei den Probanden der Verumgruppe zum einen am Ende der Konditionierung ($p = .007$) und zum anderen als konditionierter Effekt am Ende der Reexposition ($p = .003$). In der Abbildung 3.16 sind diese Veränderungen der absolute Zellzahlen dargestellt.

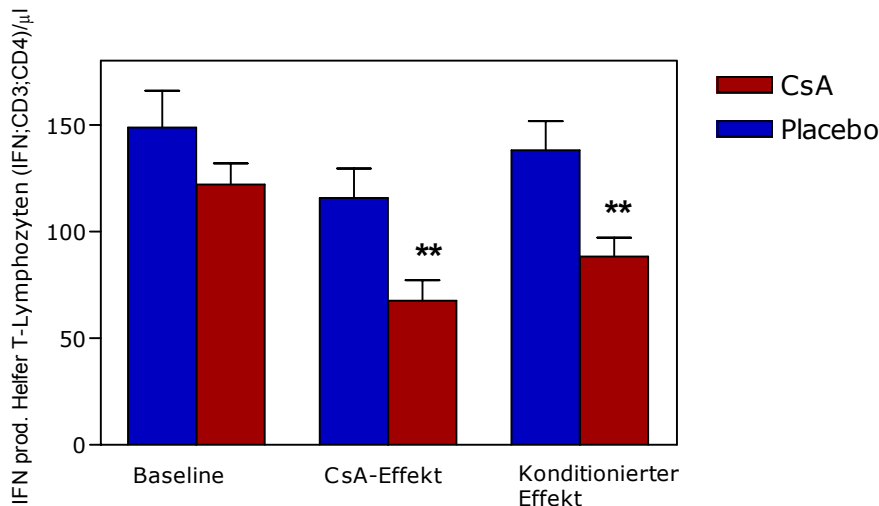


Abbildung 3.16: Mittelwerte (\pm SEM) der IFN- γ synthetisierenden Helfer T-Zellen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (**, $p \leq .01$ in *post hoc* Analyse)

Interferon- γ -Synthese der zytotoxischen T-Zellen (CD3; CD8)

Die zytotoxischen T-Lymphozyten der Verumgruppe wurden ebenfalls durch Cyclosporin A deutlich in ihrer Interferon- γ Synthese beeinträchtigt ($p = .03$), was sich als Tendenz über die Messzeitpunkte auch am Ende der Reexposition erkennen ließ ($F(2,52) = 3.5$, $p = .037$). Hier erreichten die Werte allerdings keine signifikante Ausprägung ($p = .08$) (Abbildung 3.17).

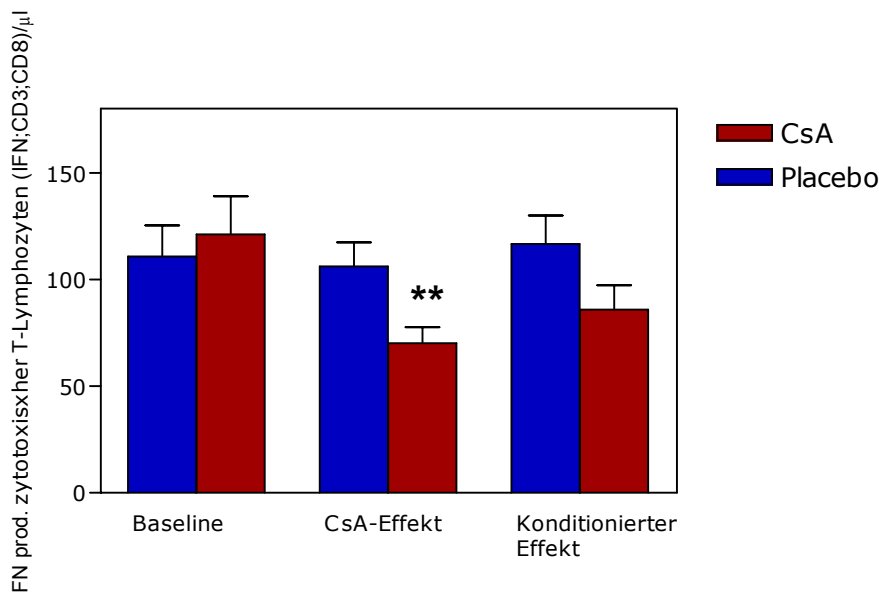


Abbildung 3.17: Mittelwerte (\pm SEM) der IFN- γ synthetisierenden zytotoxischen T-Zellen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (**, $p \leq .01$ in *post hoc* Analyse)

3.5.4 Zytokinsekretion stimulierter Lymphozyten *in vitro*

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnten im Überstand mittels ELISA die Konzentrationen der Zytokine Interleukin-2 und Interferon- γ als Maß für die Sekretionskapazität stimulierter T-Lymphozyten gemessen werden.

Interleukin-2

Bei der Interleukin-2 Bestimmung der Verumgruppe ($F(2,40)=2.28$, $p=.02$, Zeiteffekt) war nicht nur eine signifikante Reduktion der Konzentration am Ende des Konditionierungen mit Cyclosporin A ($p=.017$), sondern auch am Ende der Reexpositionswoche ($p=.04$), nach Gabe von Placebokapseln zusammen mit dem neuartigen Getränk in beiden Versuchsgruppen, zu verzeichnen (Abbildung 3.18).

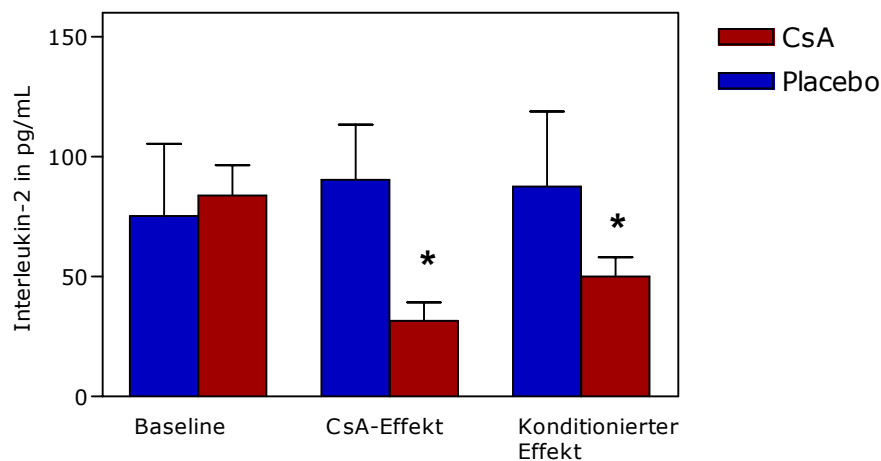


Abbildung 3.18: Mittelwerte (\pm SEM) der IL-2 Produktion im Überstand aktivierter Zellen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (*, $p \leq .05$ in *post hoc* Analyse)

Interferon- γ

Auch die Konzentrationen des Zytokins Interferon- γ (IFN- γ) wiesen ähnliche Veränderungen wie bei der IL-2 Bestimmung auf ($F(2,56)=3.2$, $p=.046$, Zeiteffekt) ($F(2,28)=5.5$, $p=.046$, Gruppeneffekt). Die Gabe des CsA führte zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ nach der Konditionierungswoche ($p=.004$). Aber auch nach der zweiten Woche zeigte sich diese verminderte Konzentration ($p=.05$) (Abbildung 3.19).

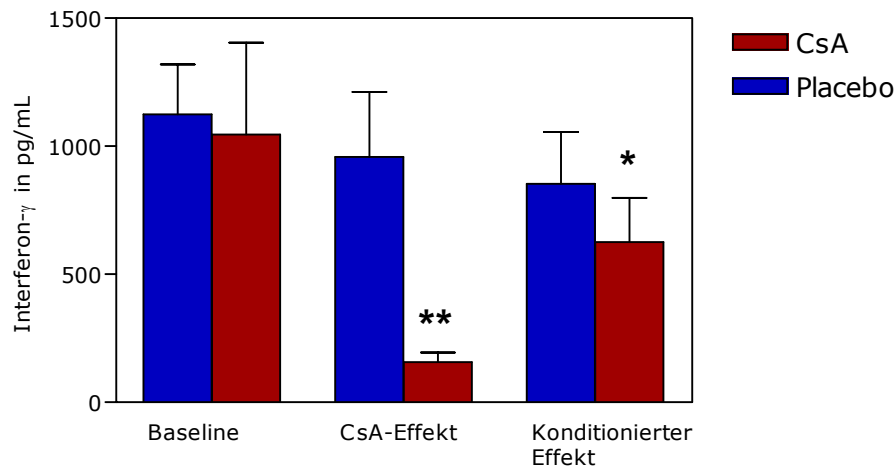


Abbildung 3.19: Mittelwerte (\pm SEM) der IFN- γ Produktion im Überstand aktivierter Zellen der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (**, $p \leq .01$; *, $p \leq .05$ in *post hoc* Analyse)

3.6 Endokrinologische Parameter

Kortisol

Bei der Bestimmung des Kortisolspiegels im Plasma der Probanden konnten signifikante Veränderungen für beide Untersuchungsgruppen über den Studienzeitraum vermerkt werden ($F(2,52)=127.02$, $p < .01$, Zeiteffekt). Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Analysen ergaben signifikant erniedrigte Spiegel für den Messzeitpunkt am Ende der Konditionierungswoche (3. Tag 10 Uhr) ($p=.001$) und am Ende der Repositionswoche (10. Tag 10 Uhr) ($p=.01$) gegenüber der Bestimmung die am 1. Tag um 8 Uhr erfolgte (Abbildung 3.20).

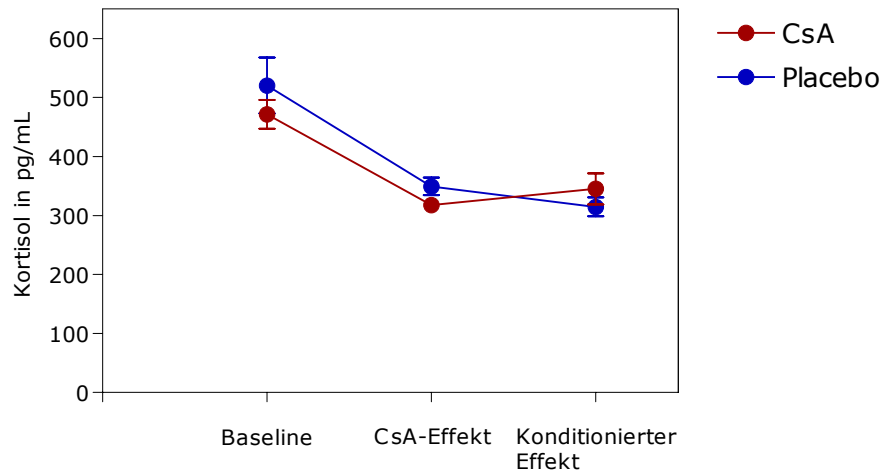


Abbildung 3.20: Mittelwerte (\pm SEM) der Kortisolkonzentration im Plasma der Verum- und Placebogruppe vor Beginn (als Baseline) und nach Ende der Konditionierung und am Ende der Reexposition (**, $p \leq .01$, *, $p \leq .05$ in *post hoc* Analyse)

In Anbetracht der zirkadianen Rhythmik des Kortisolspiegels beim Menschen war die Betrachtung der Werte in Relation zu den physiologischen Kortisolkonzentrationen von Bedeutung (Herold 2002). Die in der Studie gefundenen Werte variierten stets in den physiologischen Referenzbereichen und zeigten somit während des gesamten Studienzeitraums keine pathologischen Auffälligkeiten.

4 Diskussion

Zahlreiche tierexperimentelle Studien konnten bisher die Klassische Konditionierung immunmodulatorischer Effekte auf eindrucksvolle Art und Weise demonstrieren (Ader & Cohen 2001). Erste Studien zur Frage der therapeutischen Relevanz befassten sich mit dem Einsatz der Klassischen Konditionierung bei Transplantationsexperimenten und Autoimmunerkrankungen bei Tieren. In den Bereichen der Transplantationsmedizin konnte im Tiermodell die Zeit bis zur Abstoßung eines Transplantates (Exton et al. 1998a) und im Bereich der Autoimmunerkrankungen die Überlebenszeit der Tiere (Ader & Cohen 1982) signifikant verlängert werden. Diese erfolgreichen tierexperimentellen Studien legten eine Anwendung im humanmedizinischen Bereich nah. Erste Studien dieser Art wiesen positive Ergebnisse auf (Stockhorst et al. 2000a), doch sind bisher die grundlegenden Daten, die quantitativ zeigen, dass die Klassische Konditionierung immunmodulatorischer Reaktionen beim Menschen möglich ist, unzureichend.

In der hier vorgestellten Studie sollte daher bei einer größeren Probandenzahl in einem doppelblinden Versuchsaufbau dieser Fragestellung nachgegangen werden. Die 34 gesunden männlichen Probanden wurden hierzu nach dem Zufallsprinzip einer Verum- und Placebogruppe zugeteilt. Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten die Probanden in der ersten Woche, der Konditionierungsphase, ein Immunsuppressivum oder identisch aussehende Placebokapseln in Kombination mit einem neuartigen Geschmacksreiz in Form eines Getränks. Als Immunsuppressivum diente Cyclosporin A, das in der Transplantationsmedizin weit verbreitet ist und auch in tierexperimentellen Konditionierungsstudien wiederholt erfolgreich eingesetzt wurde. Die CS-UCS Paarungen erfolgten in der ersten Woche viermal in einem Abstand von 12 Stunden. Während der Reexposition in der zweiten Woche wurden allen Probanden unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit Placebokapseln mit dem neuartigen Stimulus dargeboten. Die Präsentation verlief nach dem Schema der ersten Woche wiederum viermal. An vier Messzeitpunkten, vor Beginn und am Ende der einzelnen Wochen, wurde das Blut der Probanden immunologisch, endokrinologisch und molekularbiologisch auf funktionelle und absolute Veränderungen im Immunsystem und zur Abschätzung von Stresseffekten oder möglichen Mechanismen der Vermittlung der Konditionierung untersucht. Aus dieser Studie befaßt sich die vorliegende Dissertation mit der Bestimmung funktioneller

Parameter wie der Kapazität der Zytokinsekretion und der intrazellulären Zytokinsynthese stimulierter Lymphozyten. Das Differentialblutbild und die in der Durchflusszytometrie bestimmte Distribution der Lymphozyten im peripheren Blut dienen der Absicherung gegenüber Veränderungen in der absoluten Zellzahl und Populationszusammensetzung. Außerdem sollten die beiden letztgenannten Untersuchungen einen möglichen Einfluss von Stress kontrollieren. Dies erfolgte auch durch die Bestimmung endokrinologischer Parameter wie z.B. des Cortisolspiegels im Plasma. Die Messung des Cortisols sollte aber auch den möglichen Einfluss der HPA-Achse als Mechanismus der Konditionierung darstellen. Parallel wurden mittels der Lymphozytenproliferation und der mRNA-Expression der relevanten Zytokine weitere funktionelle immunologische Parameter erhoben. Diese werden in dieser Dissertation nicht ausführlich aufgeführt, aber zur Analyse der Ergebnisse herangezogen (Goebel et al. 2002).

4.1 *Geschmacksaversion*

Der Getränkebogen mit einer neunstufigen Skala diente der Erfassung der subjektiven Beurteilung des Getränks bezüglich der Qualitäten Geschmack, Geruch und Neuartigkeit. Er sollte überprüfen, ob eine Aversion in diesen Bereichen im Sinne des Geschmacksaversionssparadigma nach Garcia (Garcia et al. 1955) aufgetreten ist. Die CTA ist ein erster Hinweis auf eine erfolgreiche Konditionierung, wenn gleich die Gruppe von Klosterhalfen zeigen konnte, dass auch ohne Geschmacksaversion eine Konditionierung mit Cyclosporin A möglich ist (Klosterhalfen & Klosterhalfen 1990). Im Tiermodell wird dies CTA meist durch die Trinkmenge der eingesetzten Lösung und dem Verhalten des Versuchstieres gegenüber der Lösung und Lokalität aufgezeigt (Exton et al. 1998c). Dieses Vorgehen war in dieser Studie beim Menschen nicht möglich, da das Studienprotokoll sich auf die vollständige Aufnahme des neuartigen Getränks stützte. Es sollte bewirken, dass der Geschmack auch nach zwei Stunden zum Eintritt des Maximalvollblutspiegels von Cyclosporin A präsent war.

Die signifikanten Gruppenunterschiede gegen Ende der ersten Woche und zu Beginn der Reexpositionswche, die sich in einer subjektiv schlechteren Beurteilung des Geschmacks durch die Probanden der Verumgruppe auszeichnete, deuten das Bestehen einer Geschmacksaversion in dieser Studie an.

4.2 Kardiovaskuläre Parameter

Bei jeder Blutabnahme wurden kardiovaskuläre Parameter wie Puls und Blutdruck protokolliert. Sie dienten der Kontrolle zum einen der Ermittlung von Stresseffekten und zum anderen der Überprüfung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen des CsA.

Stresseffekte im bezug auf das kardiovaskuläre System äußern sich in einem Anstieg der Katecholamine, die über die Kontraktion der Gefäßwandmuskulatur eine Erhöhung der Herzfrequenz und des arteriellen Blutdruckes zur Folge hat (Wuttke 1990). Die Daten zeigten, dass weder der Puls noch der Blutdruck eine Erhöhung der Werte zu keinem Zeitpunkt und in keiner der beiden Untersuchungsgruppen erfahren hat.

Eine bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkung des Immunsuppressivums besteht in der pathologischen Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutdrucks (Rote Liste 2003). Auch dies konnte bei den - sich stets in den physiologischen Bereichen befindenden - Werten ausgeschlossen werden.

4.3 Zirkulation und Distribution der Leukozyten

Das Differentialblutbild zeigte, dass die Gesamtleukozytenzahlen und deren Distribution in Lympho-, Mono- und Granulozyten stets in den physiologischen Referenzbereichen variierten und keine Veränderungen zwischen den Gruppen und über den Studienzeitraum hinweg aufwiesen.

Auch die in der Durchflusszytometrie gemessenen Lymphozytensubpopulationen, die mit Hilfe des Differentialblutbildes in absolute Zahlen umgerechnet werden konnten, ergaben keinen weiteren Anhalt für eine Beeinflussung der absoluten Zellzahlen durch die Konditionierung mit Cyclosporin A oder Placebogabe. Im Detail konnte dies für die Unterteilung der T-Lymphozyten in Helfer und zytotoxische T-Zellen, für die B-Zellen und die NK-Zellen ausgeschlossen werden.

Dies ist wichtig für mehrere Aspekte. Zum einen ist aus der Literatur bekannt, dass Stress, der sich in einer akuten Sympathikusaktivierung äußert, Veränderungen in der Zellzusammensetzung und ihrer Zirkulation in der Peripherie bewirken kann (Benschop et al. 1996). Speziell die NK-Zellen sind sehr empfänglich für die Auswirkungen von akutem psychologischem Stress (Benschop et al. 1996). So zeigten Personen mit negativem Lebensereignis oder Prüfungsstress eine

abgeschwächte NK-Zellaktivität und eine Verringerung der T-Zellzahlen im peripheren Blut (Glaser et al. 1986).

Für die Interpretation der Ergebnis ist es zudem wichtig, ob Cyclosporin A ebenfalls auf die NK-Zellen wirkt. Dieses wird in der Literatur verneint (Kasaian & Biron 1990) und somit können die gleichbleibenden Werte für die absoluten Zellzahlen und insbesondere der NK-Zellen als Zeichen für einen fehlenden Stresseffekt gewertet werden.

Zum anderen ist es für die folgenden Darlegungen von Interesse, dass die konditionierten Effekte analog der CsA-Wirkung einen funktionellen Einfluss auf das Immunsystem ausüben und sich daher nicht auf Veränderungen in der Zirkulation und Distribution der Lymphozyten zurückführen lassen.

4.4 Zytokinsynthese der T-Lymphozyten

Cyclosporin A ist ein Immunsuppressivum, das speziell die zelluläre Abwehr durch die T-Lymphozyten beeinträchtigt. Bei der Vermittlung dieser Effekte sind Zytokine von zentraler Bedeutung, speziell die Zytokine Interleukin-2 und Interferon- γ . Wenn diese durch die Wirkung von CsA weniger synthetisiert werden, sind Aktivierung, Wachstum und Differenzierung der T-Zellen gehemmt. Diese funktionellen Veränderungen des Immunsystems wurden im bezug auf die Zytokinsynthese der T-Lymphozyten zum einen im Überstand nach 24-stündiger Stimulation der T-Lymphozyten mit PHA und zum anderen in der Durchflusszytometrie als intrazelluläre Konzentrationen der einzelnen Subpopulationen nach 4-stündiger Stimulation mit PMA/Ionomycin quantitativ erfasst. Wie erwartet, zeigte sich in beiden Untersuchungsmethoden ein signifikanter Rückgang der Interleukin-2 und Interferon- γ Synthese in der Probandengruppe, die Cyclosporin A erhalten hatte. Die Placebogruppe hingegen wies zu keinem Messzeitpunkt Veränderungen abweichend zu den Ausgangswerten auf.

Die genannten funktionellen Parameter wurden allerdings nicht nur zur Bestimmung der CsA-Effekte nach Ablauf der Konditionierung, sondern auch zur Erfassung der konditionierten Effekte nach der Reexposition bestimmt.

Entscheidend für die Diskussion der konditionierten Effekte ist der Nachweis, dass zu Beginn der Reexposition keine Residualeffekte durch die CsA-Gabe in der vorangegangenen Woche vorhanden waren. In einer Teilgruppe von 21 Probanden

konnte dies in einem weiteren Messzeitpunkt vor Beginn der Reexposition durch den Rückgang der Parameter auf Ausgangsniveau bewiesen werden.

Konditionierte Effekte auf die Zytokinsynthese stimulierter T-Lymphozyten

Nach einer 24stündigen Stimulation der Zellen mit PHA konnten im Überstand mittels ELISA die Konzentrationen der Zytokine Interleukin-2 und Interferon- γ als Maß für die Produktion stimulierter T-Lymphozyten gemessen werden.

Dabei zeigte sich, dass sich nach der Reexposition die konditionierten Effekte analog der CsA-Effekte der Konditionierungswoche verhielten. Sowohl für Interleukin-2 als auch für Interferon- γ zeigten sich signifikant verminderte Konzentrationen bei den Probanden, die konditioniert wurden. Beispielsweise für Interleukin-2 ließ sich nach der CsA-Gabe eine Reduktion von 65 % und als konditionierter Effekt eine Verminderung um 53 % gegenüber der Placebogruppe ermitteln.

Da sich diese Reduktionen allerdings auch durch Verminderungen der absoluten Zellzahlen erklären lassen würden, ist es wichtig, sie vor dem Hintergrund dieser zu interpretieren. Sowohl im Differentialblutbild als auch bei der Bestimmung der Subpopulationen im FACS ergaben sich keine Hinweise auf eine Veränderung der absoluten Zellzahlen und der Distribution in den Subpopulationen für die Leukozyten. Dies bedeutet für die verminderten Zytokinkonzentrationen in der Reexpositionswoche, dass die Reduktionen eindeutig funktioneller Art waren.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen aus Konditionierungsversuchen am Tier. Eine dieser Arbeiten beschäftigte sich auch mit der Frage nach den Konzentrationen von Zytokinen im Überstand als konditionierter Effekt. Exton et al. fanden heraus, dass sich eine Reduktion von Zytokinen der Splenozyten *in vitro* konditionieren lässt, wenn zuvor Cyclosporin A mit einer für Ratten neuartigen Substanz, einer Saccharinlösung assoziiert wurde (Exton et al. 1998b).

Konditionierte Effekte auf die intrazelluläre Zytokinproduktion

Nach Stimulation der T-Lymphozyten und anschließender Perforation ihrer Zellmembranen konnten mit Fluoreszenzfärbungen intrazelluläre Zytokine, Interleukin-2 und Interferon- γ , im FACS dargestellt werden und auf Einzelzellniveau mittels Phänotypisierung durch Oberflächenantikörper gemessen werden (Sander et al. 1991). Die intrazelluläre Zytokinsynthese wurde zum einen für die T-Lymphozyten

insgesamt und zum anderen für die Aufteilung derer in die Subpopulationen Helfer und zytotoxische T-Zellen ermittelt. Mit Hilfe des Differentialblutbildes konnten die Werte in absolute Zellzahlen umgerechnet werden.

Für das Zytokin Interleukin-2 wurden für alle drei Populationen nicht nur signifikant erniedrigte Konzentrationen nach der CsA-Gabe, sondern auch nach Beendigung der Reexposition gefunden. Bei der Subpopulation der Helfer T-Zellen war der konditionierte Effekt am deutlichsten mit einer Reduktion um 52 % analog der CsA-Wirkung mit einer Verminderung um 83 % zu vermerken.

Auch für Interferon- γ waren die konditionierten Effekte auf Ebene der Helfer T-Zellen am Markantesten. Eine Reduktion von 36 % nach der Reexposition gegenüber einer Verminderung durch die Wirkung von CsA um 42 % machen deutlich, dass auch dieses Zytokin in seiner Synthese durch Konditionierung signifikant beeinflusst wurde. Auch in der Gesamtzahl der IFN- γ produzierenden T-Lymphozyten und der Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen ist dieser Effekt, wenn auch nicht so ausgeprägt wie für die Helfer T-Zellen, zu verzeichnen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer anderen Konditionierungsstudie mit Cyclosporin A.. Die Gruppe um Exton präsentierte 1999 eine Studie, in der sie durch konditionierte Immunsuppression die Medikamentenwirkung von Cyclosporin A verstärkten und diese anhand der Transplantatüberlebenszeit bei heterotop herztransplantierten Ratten beobachteten. Im Rahmen dieser Studie versuchten sie den Mechanismus der konditionierten Suppression im Vergleich zu der CsA-Wirkung auf intrazellulärer Ebene der Interferon- γ Synthese zu verfolgen. Der konditionierte Effekt verhielt sich hier nicht analog der CsA-Wirkung, sondern zeigte sich in einem signifikanten Anstieg der Interferon- γ Synthese. Dies widerspricht den Ergebnissen, die in unserer Studie gefunden wurden. Das Design der beiden Studien unterscheidet sich in zwei wichtigen Punkten, zum einen ist die eine tier- und die andere humanexperimentell und somit nicht direkt vergleichbar. Zum anderen wurden in der humanexperimentellen Studie die funktionellen Veränderungen des Immunsystems bis auf die Ebene der mRNA-Synthese der relevanten Zytokine verfolgt. Dort fand sich analog der CsA-Wirkung eine Suppression in der Biosynthese, mit der eine Suppression auf Niveau der intrazellulären Synthese in Einklang stehen würde. Die Ergebnisse zur mRNA-Synthese sind nicht Bestandteil dieser Dissertation und werden daher hier nur zur Unterstützung herangezogen (Goebel et al. 2002).

4.5 Cortisol

Das Hormon Cortisol ist ein Botenstoff der HPA-Achse und steigt nach psychischer Belastung an. Das Hormon unterliegt im menschlichen Organismus einer zirkadianen Rhythmik mit einem Maximalspiegel um ca. 8 Uhr morgens, der steil im weiteren Verlauf des Vormittags abfällt und Nachts um ca. 2 Uhr seinen Tiefpunkt erreicht.

Das Design des Studienprotokolls sah bei den 4 Messzeitpunkten unterschiedliche Tageszeiten für die Blutentnahmen vor. Sowohl zu Beginn der Konditionierung als auch der Reexposition (1. und 8.Tag) fanden die Blutentnahmen um 8 Uhr morgens statt. Am Ende der jeweiligen Woche (3. und 10. Tag) hingegen wurde die Blutentnahme ca. 90 – 120 min später durchgeführt, damit die Entnahme in etwa zeitgleich mit dem zu erwartenden Maximalspiegel der CsA-Konzentration im Blut stattfand. Vor dem Hintergrund der zirkadianen Rhythmik traten - wie zu erwarten - niedrigere Cortisolblutspiegel zu den Blutentnahmen um 10 Uhr auf als zu jenen um 8 Uhr morgens. Dies bedeutet für die Interpretation der Ergebnisse, dass man nicht die einzelnen Messzeitpunkte zueinander vergleichen kann, sondern nur den Wert zu Beginn der Konditionierungswoche (1.Tag) mit dem Wert zu Beginn der Reexpositions-woche (8.Tag) und entsprechendes für die Werte am Ende der jeweiligen Woche (3. und 10. Tag).

Die Werte ergaben keine signifikanten Unterschiede zu diesen Zeitpunkten und zu keinem Messzeitpunkt konnten Gruppenunterschiede vermerkt werden. Des weiteren ist zu bemerken, dass die vorgefundenen Blutspiegel sich in den physiologischen Referenzbereichen zu der jeweiligen Tageszeit befanden.

Dies lässt den Schluss zu, dass dem Hormon Cortisol kein entscheidender Einfluss im bezug auf den Erwerb der Konditionierung und der konditionierten Effekte zuzusprechen ist. Somit kann auch eine Involvierung der HPA-Achse in den Mechanismus der Konditionierung für diese Studie ausgeschlossen werden.

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Konditionierungsarbeiten nach dem Geschmacksaversionsparadigma an Tieren. Auch dort ließ sich keine vermehrte Cortisolausschüttung verzeichnen (Klosterhalfen & Klosterhalfen 1990; Exton et al. 1998b).

Wichtig für den Erfolg der Studie ist der Ausschluss von psychischen Belastungen der Probanden und hierbei insbesondere der Ausschluss von Stresseffekten. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch Stresseffekte konditionierbar sind und diese sich im

Immunsystem, zum Beispiel in einer verminderten Funktionsfähigkeit der Lymphozyten, bemerkbar machen (Lysle et al. 1988).

Aufgrund der fehlenden Gruppenunterschiede in der Cortisolplamaspiegel können die gefundenen immunmodulatorischen Effekte nicht auf Stresseffekte zurückgeführt werden.

4.6 Fazit und Ausblick

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen erstmalig, dass eine Klassische Konditionierung von immunsuppressiven Effekten des Medikamentes Cyclosporin A beim Menschen möglich ist. Die Probanden der Verumgruppe entwickelten eine Geschmacksaversion gegen das für sie neuartige Getränk, nachdem sie die Assoziation mit der immunsuppressiven Wirkung des CsA gelernt hatten. Die gefundenen Veränderungen in der Zytokinsynthese während der Reexposition stellen konditionierte Effekte auf funktioneller Ebene dar, da die absoluten Zellzahlen konstant blieben, wie im Differentialblutbild und der Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen gezeigt wurde. Die konditionierten Effekte verhielten sich analog der Wirkung des CsA, wenn auch nicht die gleichen Maximalwerte erreicht wurden. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die - hier nicht dargestellte - Untersuchung der Lymphozytenproliferation und der Expression der mRNA der relevanten Zytokine, Interleukin-2 und Interferon- γ . Auch in diesen beiden Untersuchungen konnten supprimierte Werte in der Reexpositionswoche im Sinne einer Konditionierung erhoben werden (Goebel et al. 2002).

Stress als ein möglicher Einflussfaktor auf das Immunsystem konnte in dreierlei Versuchsansätze ausgeschlossen werden. Sowohl die kardiovaskulären und die endokrinologischen Ergebnisse als auch die konstante Zellzahl und periphere Blutzellverteilung sprechen gegen eine Beteiligung von Stress an den vorgefundenen Reaktionen.

Zwar ergaben sich keine Hinweise für einen möglichen Mechanismus der Konditionierung, doch konnte eine Beteiligung der HPA-Achse an der Konditionierung durch fehlende Veränderungen im Cortisolspiegel weitestgehend ausgeschlossen werden.

Obwohl die konditionierten Effekte im Bereich des Immunsystems nicht die Stärke der medikamentösen Behandlung erreichten, kann man dennoch von einer

therapeutischen Relevanz dieser Studie sprechen. Beispiele aus dem tierexperimentellen Bereich zeigen, dass durch die Konditionierung von immunsuppressiven Effekten die benötigte Medikamentendosis zur Behandlung von Erkrankungen verringert und das Ausmaß der unerwünschten Arzneimittelwirkungen reduziert werden kann (Exton et al. 1999). Die vorliegende Studie gibt Hinweise, dass sich dies auch im humanmedizinischen Bereich replizieren ließe.

Der Einsatz des Konditionierungsmodell am Tier in einigen klinischen Bereichen wie der Behandlung immunologischer Erkrankungen oder bei der Chemotherapie onkologischer Patienten zeigen erste positive Ergebnisse auf und können vor dem Hintergrund dieser quantitativen Studie weiterausgebaut werden.

Allerdings steht vor dem Einsatz dieses Studiendesigns in klinischer Umgebung zunächst die Verifizierung des Erfolges durch Wiederholung und Vertiefung der Studie im Vordergrund. Auch ist es nötig, das vorliegende Design auf andere immunpharmakologische Substanzen zu übertragen.

Zusammenfassung

In Studien am Tier ist gezeigt worden, dass sich immunmodulatorische Funktionen klassisch konditionieren lassen. Die vorliegende Arbeit sollte analysieren, ob sich funktionelle Immunparameter auch beim Menschen als Reaktion auf die Paarung von einem neuartigen Stimulus mit einem Immunsuppressivum klassisch konditionieren lassen.

Dafür erhielten gesunde männliche Probanden nach Randomisierung auf eine Verum- (N=18) und Placebogruppe (N=16) Cyclosporin A (2,5 mg/kg Körpergewicht) oder gleich aussehende Placebokapseln zusammen mit einem neuartigen Getränk als konditioniertem Stimulus. Diese Paarung wiederholte sich insgesamt viermal im Abstand von 12 Stunden. In der darauffolgenden Woche bekamen alle Probanden nach demselben Schema viermal den neuartigen Stimulus mit Placebokapseln dargereicht. Vor und nach der Konditionierungsphase sowie nach der Reexposition und bei einer Untergruppe von 21 Probanden auch vor Beginn der Reexposition wurden Blutproben entnommen und analysiert. Die konditionierte Verumgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Reexposition analog zur Cyclosporin A-Wirkung eine deutlich supprimierte Synthese der relevanten Zytokine, Interleukin-2 und Interferon- γ , sowohl im Überstand als auch auf intrazellulärer Ebene stimulierter T-Lymphozyten. Diese konditionierten Effekte in der funktionellen Kapazität der Lymphozyten und Zytokinproduktion konnten weder auf eine veränderte Zirkulation oder Distribution der Leukozyten, noch auf Residualwirkung des Cyclosporin A zurückgeführt werden. Des Weiteren konnte eine Beeinflussung des Immunsystems durch psychologische Faktoren wie Stress und subjektive Beeinflussung der Probanden ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen neue therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung von immunassoziierten Erkrankungen mit Hilfe der Klassischen Konditionierung auf, wie beispielsweise der Einsatz von Konditionierungstechniken als supportive Therapie zu etablierten pharmakologischen Therapieschemata.

Literaturverzeichnis

1. Ader, R., Cohen, N. (1975): Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.* 37, 333-340.
2. Ader, R., Cohen, N. (1982): Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science* 215, 1534-1536.
3. Ader, R., Cohen, N. (2001a): Conditioning and Immunity. In: Ader, R., Felten, D. L., Cohen, N. (Eds.): *Psychoneuroimmunology*. 3. Ed., S. 3-34. San Diego: Academic Press
4. Ader, R., Cohen, N., Bovbjerg, D. (1982): Conditioned suppression of humoral immunity in the rat. *J. Comp Physiol Psychol.* 96, 517-521.
5. Ader, R., Grotta, L. J., Cohen, N. (1987): Conditioning phenomena and immune function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 496, 532-544.
6. Benschop, R. J., Rodriguez-Feuerhahn, M., Schedlowski, M. (1996): Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav. Immun.* 10, 77-91.
7. Booth, R. J., Petrie, K. J., Brook, R. J. (1995): Conditioning allergic skin responses in humans: a controlled trial. *Psychosom. Med.* 57, 492-495.
8. Borel, J. F. (2002): History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114, 433-437.
9. Bovbjerg, D., Kim, Y. T., Siskind, G. W., Weksler, M. E. (1987): Conditioned suppression of plaque-forming cell responses with cyclophosphamide. The role of taste aversion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 496, 588-594.
10. Bovbjerg, D. H., Redd, W. H., Jacobsen, P. B., Manne, S. L., Taylor, K. L., Surbone, A., Crown, J. P., Norton, L., Gilewski, T. A., Hudis, C. A., . (1992): An experimental analysis of classically conditioned nausea during cancer chemotherapy. *Psychosom. Med.* 54, 623-637.
11. Burmester, G. R., Pezzutto, A. (1998): *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik*. Stuttgart; New York: Thieme S. 244.
12. Cebrian, M., Yague, E., Rincon, M., Lopez-Botet, M., de Landazuri, M. O., Sanchez-Madrid, F. (1988): Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168, 1621.
13. Coussons-Read, M. E., Dykstra, L. A., Lysle, D. T. (1994): Pavlovian conditioning of morphine-induced alterations of immune status: Evidence for opioid receptor involvement. *J. Neuroimmunol.* 55, 204-217.
14. Exton, M. S., Gierse, C., Meier, B., Mosen, M., Xie, Y., Frede, S., Goebel, M. U., Limmroth, V., Schedlowski, M. (2002): Behaviorally conditioned immunosuppression in the rat is regulated via noradrenaline and beta-adrenoceptors. *J. Neuroimmunol.* 131, 21-30.

15. Exton, M. S., Schult, M., Donath, S., Strubel, T., Bode, U., del Rey, A., Westermann, J., Schedlowski, M. (1999): Conditioned immunosuppression makes subtherapeutic cyclosporin effective via splenic innervation. *Am. J. Physiol* 276, 1710-1717.
16. Exton, M. S., Schult, M., Donath, S., Strubel, T., Nagel, E., Westermann, J., Schedlowski, M. (1998a): Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Transplant. Proc.* 30, 2033.
17. Exton, M. S., von Auer, A. K., Buske-Kirschbaum, A., Stockhorst, U., Gobel, U., Schedlowski, M. (2000): Pavlovian conditioning of immune function: animal investigation and the challenge of human application. *Behav. Brain Res.* 110, 129-141.
18. Exton, M. S., von Horsten, S., Schult, M., Voge, J., Strubel, T., Donath, S., Steinmüller, C., Seeliger, H., Nagel, E., Westermann, J., Schedlowski, M. (1998b): Behaviorally conditioned immunosuppression using cyclosporine A: central nervous system reduces IL-2 production via splenic innervation. *J. Neuroimmunol.* 88, 182-191.
19. Exton, M. S., von Horsten, S., Voge, J., Westermann, J., Schult, M., Nagel, E., Schedlowski, M. (1998c): Conditioned taste aversion produced by cyclosporine A: concomitant reduction in lymphoid organ weight and splenocyte proliferation. *Physiol Behav.* 63, 241-247.
20. Garcia, J., Kimmeldorf, D. J., Koelling, R. A. (1955): Conditioned aversion to Saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122, 157-158.
21. Garcia, J., Lasiter, P. S., Bermúdez-Rattoni, F. (1985): A general theory of aversion learning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 443, 8-21.
22. Gauci, M., Husband, A. J., Saxarra, H., King, M. G. (1994): Pavlovian conditioning of nasal tryptase release in human subjects with allergic rhinitis. *Physiol Behav.* 55, 823-825.
23. Ghanta, V. K., Hiramoto, R. N., Solvason, H. B., Spector, N. H. (1985): Neural and environmental influences on neoplasia and conditioning of NK activity. *J. Immunol.* 135, 848-852.
24. Giang, D. W., Goodman, A. D., Schiffer, R. B., Mattson, D. H., Petrie, M., Cohen, N., Ader, R. (1996): Conditioning of cyclophosphamide-induced leukopenia in humans. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 8, 194-201.
25. Glaser, R., Rice, J., Speicher, C. E., Stout, J. C., Kiecolt-Glaser, J. K. (1986): Stress depresses interferon production by leukocytes concomitant with a decrease in natural killer cell activity. *Behav. Neurosci.* 100, 675-678.
26. Goebel, M. U. (2003): *Klassische Konditionierung immunsuppressiver Effekte beim Menschen*. Göttingen: Cuvillier Verlag.
27. Goebel, M. U., Trebst, A. E., Steiner, J., Xie, Y. F., Exton, M. S., Frede, S., Canbay, A. E., Michel, M. C., Heemann, U., Schedlowski, M. (2002): Behavioral conditioning of immunosuppression is possible in humans. *FASEB J.* 16, 1869-1873.
28. Gorkzynski, R. M. (1990): Conditioned enhancement of skin allografts in mice. *Brain Behav. Immun.* 4, 85-92.
29. Gorkzynski, R. M., Macrae, S., Kennedy, M. (1982): Conditioned immune response associated with allogenic skin grafts in mice. *J. Immunol.* 129, 704-709.

30. Grochowicz, P. M., Schedlowski, M., Husband, A. J., King, M. G., Hibberd, A. D., Bowen, K. M. (1991): Behavioral conditioning prolongs heart allograft survival in rats. *Brain Behav. Immun.* 5, 349-356.
31. Herold, G. (2002): *Innere Medizin.* 2002, S. 639.
32. Hiramoto, R. N., Hsueh, C. M., Rogers, C. F., Demissie, S., Hiramoto, N. S., Soong, S. J., Ghanta, V. K. (1993): Conditioning of the allogeneic cytotoxic lymphocyte response. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 275-280.
33. Hsueh, C. M., Chen, S. F., Huang, H. J., Ghanta, J. K., Hiramoto, R. N. (1996): Activation of μ -opioid receptors are required for the conditioned enhancement of NK cell activity. *Brain Res.* 737, 263-268.
34. Hsueh, C. M., Kuo, J. S., Chen, S. F., Huang, H. J., Cheng, F. C., Chung, L. J., Lin, R. J. (1999): Involvement of catecholamines in recall of the conditioned NK cell response. *J. Neuroimmunol.* 94, 172-181.
35. Hsueh, C. M., Rogers, C., Hiramoto, R. N., Ghanta, V. K. (1994): Effect of dexamethasone on conditioned enhancement of natural killer cell activity. *Neuroimmunomodulation.* 1, 370-376.
36. Husband, A. J., King, M. G., Brown, R. (1987): Behaviorally conditioned modification of T cell subset ratios in rats. *Immunology Letters* 14, 91-94.
37. Husband, A. J., Lin, W., Madsen, G., King, M. G. (1993b): A conditioning model for immunostimulation: Enhancement of the antibody response to ovalbumin by behavioral conditioning in rats. Husband, A. J. *Psychoimmunology : CNS-immune interactions.* 1. Ed., S. 139-147. CRC Press
38. Kasaian, M. T., Biron, C. A. (1990): Cyclosporin A inhibition of interleukin 2 gene expression, but not natural killer cell proliferation, after interferon induction *in vivo*. *J. Exp. Med.* 171, 745.
39. Kelly, K. W., Dantzer, R., Mormede, P., Salmon, H., Aynaud, J. (1985): Conditioned taste aversion suppresses induction of delayed-type hypersensitivity immune reaction. *Physiol Behav.* 34, 189-193.
40. Klosterhalfen, S., Klosterhalfen, W. (1987): Classically conditioned effects of cyclophosphamide on white blood cell counts in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 496, 569-577.
41. Klosterhalfen, W., Klosterhalfen, S. (1983): Pavlovian conditioning of immunosuppression modifies adjuvant arthritis in rats. *Behav. Neurosci.* 97, 663-666.
42. Klosterhalfen, W., Klosterhalfen, S. (1990): Conditioned cyclosporine effects but not conditioned taste aversion in immunized rats. *Behav. Neurosci.* 104, 716-724.
43. Kusnecov, A. V., Husband, A. J., King, M. G. (1988): Behaviorally conditioned suppression of mitogen-induced proliferation and immunoglobulin production: Effect of time span between conditioning and reexposure to the conditioned stimulus. *Brain Behav. Immun.* 2, 198-211.
44. Kusnecov, A. V., Sivyer, M., King, M. G., Husband, A. J., Cripps, A. W., Clancy, R. L. (1983): Behaviorally conditioned suppression of the immune response by antilymphocyte serum. *J. Immunol.* 130, 2117-2120.

45. Lison, A. E. (1998): Ciclosporin: Standard in der Basis-Immunsuppression: Aktuelle pharmakologische und klinische Ergebnisse. *Innovartis* 4, 15-19.
46. Longo, D. L., Duffey, P. L., Kopp, W. C., Heyes, M. P., Alvord, W. G., Sharfman, W. H., Schmidt, P.J., Rubinow, D. R., Rosenstein, D. L. (1999): Conditioned immune response to interferon- γ in humans. *Clin. Immunol.* 90, 173-181.
47. Lüllmann, H., Mohr, K. (2001): Taschenbuch der Pharmakologie. 4. Auflage, S. 308-319.
48. Lysle, D. T., Cunnick, J. E., Fowler, H., Rabin, B. S. (1988): Pavlovian conditioning of shock-induced suppression of lymphocyte reactivity: acquisition, extinction, and preexposure effects. *Life Sci.* 42, 2185-2194.
49. Lysle, D. T., Cunnick, J. E., Maslonek, K. A. (1991): Pharmacological manipulation of immune alterations induced by an aversive conditioned stimulus: Evidence for a β -adrenergic receptor-mediated Pavlovian conditioning process. *Behav. Neurosci.* 105, 443-449.
50. Meier, B. A., Goebel, M. U., Gierse, C., Exton, M. S., Schedlowski, M. (2002): Klassische Konditionierung von Immunfunktionen: Mechanismen und klinische Relevanz. *Z. Med. Psychol.* 11, 83-93.
51. Metal'nikov, S., Chorine, V. (1926): Role des reflexes conditionnels dans l'immunité. *Annals L'Institute Pasteur* 40, 893-900.
52. Morato, E. F., Gerbase-DeLima, M., Gorczyński, R. M. (1997): Conditioned immunosuppression of lipopolysaccharide-induced antibody response of orally immunized mice. *Brain Behav. Immun.* 11, 133-139.
53. Olness, K., Ader, R. (1992): Conditioning as an adjunct in the pharmacotherapy of lupus erythematosus. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 13, 124-125.
54. Pacheco-Lopez, G., Espinosa, E., Zamorano-Rojas, H. M., Ramirez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F. (2002): Peripheral protein immunization induces rapid activation of the CNS, as measured by c-Fos expression. *J. Neuroimmunol.* 131, 50-59.
55. Perez, L., Lysle, D. T. (1997): Conditioned immunomodulation: Investigation of the role of endogenous activity at μ , κ , δ opioid receptor subtypes. *J. Neuroimmunol.* 79, 101-112.
56. Ramírez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., Bermúdez-Rattoni, F. (1998): Differential effects of NMDA-induced lesions into the insular cortex and amygdala on the acquisition and evocation of conditioned immunosuppression. *Brain Behav. Immun.* 12, 149-160.
57. Ramírez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F. (1999): Conditioned enhancement of antibody production is disrupted by insula and amygdala but not hippocampal lesions. *Brain Behav. Immun.* 13, 46-60.
58. Resch, K., Szamel, M. (1997): Molecular mechanisms of the immunosuppressive action of Cyclosporin A. *Int. J. Immunopharmac.* 19, 579-585.
59. Rogers, M. P., Reich, P., Strom, T. P., Carpenter, C. B. (1976): Behaviorally conditioned immunosuppression: Replication of a recent study. *Psychosom. Med.* 38, 447-452.
60. Rote Liste Service GmbH (2003): Rote Liste. 2003, S. 51118.

61. Sander, B., Andersson, J., Andersson, U. (1991): Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol. Rev.* 119, 65-93.
62. Smith, R. G., McDaniel, S. M. (1983): Psychologically mediated effects on the delayed hypersensitivity reaction to tuberculin in humans. *Psychosom. Med.* 45, 65-70.
63. Solvason, H. B., Ghanta, V. K., Soong, S. J., Rogers, C. F., Hsueh, C. M., Hiramoto, N. S., Hiramoto, R. N. (1992): Naltrexone blocks the expression of the unconditioned elevation of natural killer cell activity in BALB/c mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 199, 199-203.
64. Stockhorst, U., Spennes-Saleh, S., Korholz, D., Gobel, U., Schneider, M. E., Steingruber, H. J., Klosterhalfen, S. (2000a): Anticipatory symptoms and anticipatory immune responses in pediatric cancer patients receiving chemotherapy: features of a classically conditioned response? *Brain Behav. Immun.* 14, 198-218.
65. Stockhorst, U., Spennes-Saleh, S., Körholz, D., Göbel, U., Schneider, M. E., Steingrüber, H.-J., Klosterhalfen, S. (2000b): Anticipatory symptoms and anticipatory responses in pediatric cancer patients receiving chemotherapy: Features of a classically conditioned response. *Brain Behav. Immun.* 14, 198-218.
66. von Horsten, S., Exton, M. S., Schult, M., Nagel, E., Stalp, M., Schweitzer, G., Voge, J., del Rey, A., Schedlowski, M., Westermann, J. (1998): Behaviorally conditioned effects of Cyclosporine A on the immune system of rats: specific alterations of blood leukocyte numbers and decrease of granulocyte function. *J. Neuroimmunol.* 85, 193-201.
67. Wuttke, W. (1990): Endokrinologie. In: Schmidt, R. F., Thews, G.(Eds.): *Physiologie des Menschen*. 24. Ed., S. 390-420. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag

Danksagung

Für seine exzellente Betreuung und Förderung möchte ich mich bei Professor Manfred Schedlowski besonders bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Professor Michel und Herrn Professor Heemann für die gute Unterstützung bei der Studie.

Ohne die Anleitung und Kompetenz von Frau Dr. Marion Goebel, ihrer Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu jedem Zeitpunkt wäre die Arbeit so nicht zustande gekommen. Ich bin ihr sehr dankbar dafür.

Auch danke ich Jan Steiner, Dr. Yu Fen Xie und Dr. Michael Exton für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und stellvertretend für viele für die gute Atmosphäre im Institut und Labor.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Freunden, besonders Ulrike Vordermark für ihre offene Art und Herzlichkeit.

Vielen Dank möchte ich auch meiner Familie für ihre Ermunterung und Hilfsbereitschaft aussprechen und besonders meinen Eltern möchte ich für ihr stete Begleitung, Unterstützung und Fürsorge danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Almuth Elisabeth Trebst
Geburtsdatum	11. Mai 1977
Geburtsort	Bochum
Wohnort	Bochum
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

Schulbildung

1983 – 1987	Hufeland-Grundschule, Bochum
1987 – 1996	Albert-Einstein-Gymnasium, Bochum
09/90 – 12/90	Amos De-Shalit High School, Rehovot, Israel
1996	Abitur

Studium

10/96 – 05/03	Studium der Humanmedizin
10/96 – 09/98	Vorklinisches Studium, Ruhr-Universität Bochum
09/1998	Ärztliche Vorprüfung
10/98 – 05/03	Klinisches Studium, Gesamthochschule Essen
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/02 – 03/03	Praktisches Jahr: Chirurgie, Städtische Kliniken Duisburg, Innere Medizin, Livingstone Hospital, Port Elizabeth, Südafrika Pädiatrie, Städtische Kliniken Duisburg
05/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

03/1997	Praktikum in Chirurgie, Elisabeth Krankenhaus, Bochum
08/1997	Praktikum in Chirurgie, Augusta Krankenhaus, Bochum

-
- 03/1999 Famulatur in Innerer Medizin, Augusta Krankenhaus,
Bochum
- 03/99 – 10/99 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl der Forensischen
Psychiatrie, Rheinische Kliniken Essen
- 03/2000 Famulatur am Lehrstuhl für Medizinischen Psychologie,
Gesamthochschule Essen
- 09/2000 Famulatur in Pädiatrie, Be'er Sheva Hospital, Israel
- 03/2001 Famulatur in Gynäkologie und Geburtshilfe, Alicante
Hospital, Spanien
- 07/00 – 03/01 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Medizinische
Psychologie, Gesamthochschule Essen